



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ŞEKER PANCARI (*Beta vulgaris* L.)
KROMOZOMLARININ MİKROSATELİT
LOKUSLARI BAKIMINDAN KARAKTERİZE
EDİLMESİ**

Fatıma ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Ağustos-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Fatıma ŞEN tarafından hazırlanan “Şeker Pancarı (*Beta vulgaris* L.) Kromozomlarının Mikrosatelit Lokusları Bakımından Karakterize Edilmesi” adlı tez çalışması 05/08/2019 tarihinde aŐağıdaki jüri tarafından oy birliğı ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Önder TÜRKMEN

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU

Üye

Do  Dr. Emrah TORLAK

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. S. Savaş DURDURAN
FBE Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Fatima ŞEN

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ŞEKER PANCARI (*Beta vulgaris* L.) KROMOZOMLARININ MİKROSATELİT LOKUSLARI BAKIMINDAN KARAKTERİZE EDİLMESİ

Fatıma ŞEN

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU

2019, 59+x Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU

Prof. Dr. Öder TÜRKMEN

Doç Dr. Emrah TORLAK

Şeker pancarı, dünyanın ticari şekerinin % 22'sine ve ABD'nin yerli üretiminin yaklaşık yarısına kadarını üretmektedir. İlk yılda yaprak ve depo kökleri geliştiren iki yıllık bitki, ardından ikinci yıl içinde çiçek ve tohum ekimi yapılan bienal bitkidir. Bu önemli bitkiye ait en kapsamlı genomik çalışma 2014 yılında Dohm ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiş olup; 9 linkaj grubuna yeni nesil dizileme sonucu geliştirilen genom sekansları yerleştirilmiştir. Bu tez kapsamında bu kromozomlara ait sekans verileri mikrosatelit markörleri yönünden analiz edilmiş olup yeni nesil çok sayıda markör geliştirilmiştir. Bu yeni geliştirilen markör seti tezin en önemli çıktısı olmaktadır. Geliştirilmiş olan markör seti veri tabanlarında biyoinformatik olarak analiz edilerek olası protein fonksiyonları tahmin edilmiştir. Bu çalışma da başlı başına tezin önemli bir çıktısı olmaktadır. Ayrıca geliştirilmiş olan markör setinin bir kısmı ile bir şeker pancarı popülasyonu çeşitlilik yönünden karakterize edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: genetik çeşitlilik, mikrosatelit markör geliştirme, SSR markör geliştirme, şeker pancarı

ABSTRACT

MS THESIS

**CHARACTERIZATION OF SUGAR BEET (*Beta vulgaris* L.) CHROMOSOMES
FOR MICROSATELLITE LOCI**

Fatıma ŞEN

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MOLECULAR BIOLOGY AND GENETICS**

Advisor: Asst. Prof. Dr. Ali Tefvik UNCU

2019, 59+x Pages

Jury

**Asst. Prof. Dr. Ali Tefvik UNCU
Prof. Dr. Önder TÜRKMEN
Assoc. Prof. Dr. Emrah TORLAK**

Sugar beet produces 22% of the world's commercial sugar and about half of US domestic production. It is a biennial plant that develops leaf and storage roots in the first year and then flowers and seeds in the second year. The most comprehensive genomic study of this important plant was carried out in 2014 by Dohm et al., and genome sequences developed as a result of next generation sequencing were placed in 9 linkage groups. In this thesis, sequence data of these chromosomes have been analyzed in terms of microsatellite markers and many new generation markers have been developed. This newly developed marker set is the most important output of this thesis. The developed marker set was analyzed bioinformatically in the databases and possible protein functions were estimated. In addition, also this is another important outcome of this thesis. Furthermore, a sugar beet populatin was characterized about diversity with a portion of the developed marker set.

Keywords: genetic diversity, microsatellite marker development, sugar beet, ssr marker development

ÖNSÖZ

Lisans ve yüksek lisans hayatımız boyunca bize ilham kaynağı olan ve her türlü çalışmamızda bizi sonuna kadar destekleyen çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ali Tevfik UNCU'ya, çalışmalarımız boyunca bizden yardım ve desteklerini esirgemeyen çok kıymetli hocalarım Doç. Dr. Emrah TORLAK ve Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Özgür UNCU'ya, maddi manevi desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tüm bu süreçte bana eşlik eden, güzellikleri ve zorlukları birlikte paylaştığımız takım arkadaşım Şeyma Nur ERDEĞER'e, desteklerinden, katkılarından ve işbirliğinden dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca hayatımın her alanında ve her aşamasında bana destek olan ve benimle birlikte hayatı karşılayan sevgili anneme, sevgili babama ve sevgili kardeşlerime, hayatıma yön verdikleri için teşekkür ederim.

Fatma ŞEN
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİL DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Şeker Pancarı (<i>Beta vulgaris</i> L.).....	3
2.1.1. Şeker pancarının yetiştiği coğrafi konumlar	3
2.1.2. Şeker pancarı ve şeker kamışı.....	3
2.1.3 Şeker pancarı ıslahı ve genetik yapısı.....	4
2.2. Bitki Islah Çalışmaları	4
2.2.1. Markör destekli ıslah (MAS)	6
2.2.3. Genetik markörler	7
2.3. Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri ile Markör Geliştirilmesi.....	14
2.3.1. Yeni nesil dizileme yöntemleri	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	26
3.1. Şeker Pancarı Genomunun Mikrosatelit Markörleri Geliştirmek Üzere Analiz Edilmesi	26
3.1.1. DNA izolasyonu	26
3.1.2. Mikrosatelit markör analizleri	27
3.1.3. Veri analizleri	28
3.1.4. Markör geliştirme	29
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	33
4.1. Sonuçlar	33
4.1.2. Mikrosatelit markör tespiti.....	33
4.1.3. Markörlerin protein fonksiyonlarının analiz edilmesi	37
4.2. Geliştirilen SSR Markörlerinin Şeker Pancarı Genotiplerinde Test Edilmesi.....	42
4.2.1. Test edilen markörlerin polimorfizm performansı.....	45
4.2.3. Test edilen markörlerin PIC değerleri	47
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	51
ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µ: mikro
°C: santigrad derece

Kısaltmalar

AFLP: Çoğaltılmış Fragman Uzunluk Polimorfizmi
ATP: Adenozintrifosfat
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
GB: gigabaz
GBS: Sekanslama ile Genotipleme (Genotyping by sequencing)
GWAS: tüm genom ilişkilendirme ile ıslah
kb: kilobaz
kg: kilogram
MAS: Mark ör Destekli Islah
mb: megabaz
mL: mililitre
mM: milimolar
ng: nanogram
nt: nükleotit
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PIC: Polimorfizm Bilgi İçeriği
PPİ: Pirofosfat
RAPD: Rastgele Çoğaltılmış Polimorfik DNA
RFLP: Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi
RIL: rekombinant saf hat
SBS: Sentezleme il Sekanslama
SSR: Basit Tekrar Dizileri (Simple Sequence Repeats)
subsp.: alt tür
WGS: Tüm Genom Sekanslama
µL: mikrolitre
µM: mikromolar

ŞEKİL DİZİNİ

Grafik 4.1. Tablo 4’te gösterilen SSR motiflerinin ve markörlerinin tespit edilen sayılarının grafik üzerinde dağılımı.....	35
Grafik 4.2. Şeker pancarı protein sekansları ile yapılan blast sonucu tespit edilen fonksiyon değerleri.....	37
Grafik 4.3. Şeker pancarı protein sekansları ile yapılan blast sonucu tespit edilen sekans sayı değerleri.....	38
Grafik 4.4. Markör sekansları ile eşleşen protein sekanslarının olası fonksiyonlarının grafik ile gösterimi.....	39
Grafik 4.5. Genotiplerin birbirlerine olan uzaklık ve yakınlıklarının gösterimi.....	47
Şekil 2.1. RFLP markör örnek görüntüsü.....	9
Şekil 2.2. RAPD markör agaroz jel görüntüsü.....	11
Şekil 2.3. AFLP markör örnek görüntüsü.....	12
Şekil 2.4. SNP markör oluşumu.....	13
Şekil 2.5. Sanger dizileme modeli.....	17
Şekil 2.6. Illumina dizileme modeli.....	18
Şekil 2.7. Roche 454 dizileme modeli.....	20
Şekil 2.8. ABI Solid dizileme yöntemi.....	21
Şekil 3.1. GMATA iş akış şeması.....	30
Şekil 3.2. Blast2GO akış şeması.....	32
Şekil 4.1. MKBVCHR1-234 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü.....	43
Şekil 4.2. MKBVCHR7-770 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü.....	43
Şekil 4.3. MKBVCHR5-1011 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü.....	44
Şekil 4.4. MKBVCHR2-2091 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü.....	44
Şekil 4.5. MKBVCHR9-3048 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü.....	45
Şekil 4.6. Neighbour-joining yöntemi ile çizilmiş olan dendrogram.....	46

TABLO DİZİNİ

Tablo 3.1. Şeker pancarı kromozomlarından rastgele seçilmiş 10 adet markör için GMATA programında geliştirilmiş olan primer sekansları.....	28
Tablo 4.1. SSR Tespit İstatistikler.....	34
Tablo 4.2. SSR Motiflerinin tekrar nükleotit sayılarının genel gösterimi.....	34
Tablo 4.3. SSR motifleri ve sayısı.....	35
Tablo 4.4. Markör sekansları eşleşenprotein sekanslarının olası fonksiyonları.....	38
Tablo 4.5. Blast oranları %100 olan rastgele seçilmiş 50 adet markör ve olası protein fonksiyonları.....	40
Tablo 4.6. Blast oranları %100 olan rastgele seçilmiş 50 adet markör ve olası protein fonksiyonları.....	41
Tablo 4.7. Glutasyon sentezi ile ilgili olabilecek markörler ve eşleştikleri protein sekansları.....	42
Tablo 4.8. Markörlerin PIC değerleri.....	48

1. GİRİŞ

Şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) ılıman bölgelerdeki şeker üretimi için büyük bir öneme sahiptir (Smulders ve ark., 2010). Şekeri depoladıkları kökleri için yetiştirilen şeker pancarı ürünleri (*Beta vulgaris* subsp. *vulgaris*), şeker kamışı sonrası dünyanın ikinci sakkaroz kaynağıdır ve biyoyakıt hammaddesi olarak da kullanılır. Şeker pancarı ülkemiz için stratejik öneme sahip olan başlıca tarım ürünlerimizden birisidir. Dünya şeker üretiminin %30'u şeker pancarından karşılanmaktadır. Ülkemizde ise bu oran %90'ın üzerindedir. Bu tezin amacı şeker pancarı genotipleri arasında ve genetik haritalama çalışmalarında kullanılmak üzere yeni mikrosatelit markör setinin geliştirilmesi ve bu markörlerin bir şeker pancarı popülasyon setinde genotiplenmesidir. Bu amaç doğrultusunda şeker pancarı genomu mikrosatelit markörleri geliştirme amacı ile analiz edilecek ve geliştirilen markörlerin içinden panel genotiplenecektir.

Şeker pancarı dünyada şeker, biyoetanol ve hayvan yemi ihtiyacının karşılandığı önemli bir kaynaktır. 2n=18 kromozoma ve yaklaşık 758 megabaz genom büyüklüğüne sahiptir. Şeker pancarı üreticileri şeker pancarında kök verimini ve şeker içeriğini iyileştirmeye çalışırlar ve bu doğrultuda ıslah yaparlar (Wang ve ark., 2018). Ancak bu iki özellik de genetik olarak karışık bir altyapıya sahiptir. Bu durum DNA (deoksiribo nükleik asit) markörleri ile moleküler destekli ıslah çalışmalarını gerekli hale getirmiştir. Şeker pancarında yapılan ıslah çalışmaları sonucunda, şeker miktarı %8'den %18'e ulaşmıştır ve ıslah çalışmalarıyla aynı zamanda viral ve mantar hastalıklarına karşı direnç gibi özellikler de aktif olarak seçilmiştir (Dohm ve ark., 2014).

Bitki ıslah çalışmalarında DNA markörleri genetik ıslah çalışmalarına olanak sağlamaktadır. Tohum verimini artırmak için uygulanan markör destekli ıslah çalışmalarında genoma özgü moleküler markörler kullanılmaktadır. Bir bitki tohumundaki genotipik değişkenlik markör alellerindeki çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Bu durumda moleküler markörler bitki tohum koleksiyonlarını karakterize etmede önemli rol oynarlar (Uncu, 2018). Genetik markörler hem vahşi türlerde hem de ıslah edilmiş türlerde popülasyon yapısının belirlenmesi, genetik çeşitliliğin tespiti, sınıflandırma, bağlantı haritası oluşturma, istenen özellikler için alellerin haritalanması gibi çalışmaların kolaylıkla yapılmasını sağlamaktadır (Simko ve ark., 2012). Moleküler markörler fenotipik ve pedigri verilerine göre daha doğru sonuçlar vermektedir (Smith ve ark., 1992).

Ökaryotik organizmaların genomlarında basit dizi tekrarları bulunur. Bunlara SSR (mikrosatelit) markörler denir. SSR markörler bitki ıslah çalışmalarında en sık kullanılan markör çeşididir (Li ve ark., 2010). SSR markörler tekrarlanabilirlik, multialellik, ko-dominant kalıtım, PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile kolayca çoğaltılabilme ve bitki genomlarında bol miktarda bulunma özelliklerine sahiptirler (Simko ve ark., 2012; Li ve ark., 2010).



2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Şeker Pancarı (*Beta vulgaris* L.)

Şeker pancarı ılıman iklimde yetişen ve dünyanın yıllık şeker üretiminin %30'unu ve aynı zamanda biyoyakıt ve hayvan yemi ihtiyacını karşılayan önemli bir bitkidir. Çiçekli bitkiler takımına ait ve yaklaşık genom büyüklüğü 714-758 magbaz olan, $2n=18$ kromozoma sahip diploit bir bitkidir. Yapraklı pancarlar Roma zamanından beri yetiştirilirken şeker pancarı son zamanlarda kültüre edilen ve yetiştirilen bitkilerdir. On sekizinci yüzyılın sonlarında, pazı ve yem pancarının çaprazlanarak seçilmesi sonucu kök kısmında şeker biriktiren hatlar ortaya çıkmıştır. Genomik ve filogenetik incelemeler ışığında şeker pancarı referans genomunun bu şekilde ortaya çıktığı düşünülmektedir. (Dohm ve ark., 2014). Kültüre edilen ve yetiştirilen pancar, Chenopodiaceae ailesinden Beta cinsine ait olan; yem pancarı, İsviçre pazısı, kırmızı sofracı pancarı ve gen kaynakları faydalı olan sayısız yabancı pancar türünden gelmektedir (Van Geyt ve ark., 1990). Şeker pancarı aynı zamanda çeşitli iklim koşullarında iyi performans gösterebilen bir şeker kaynağıdır (Sher ve ark., 2019).

Hasat edilmiş taze şeker pancarı kökü; %75-76 su, %15-20 şeker, %4-6 küspe ve %2,6 şeker olmayan bileşen içerir. Bir ton taze şeker pancarı kökünün işlenmesi; 121 kg şeker, 38 kg melas - şeker pekmezi (18,2 kg şeker ve 7,8 kg su içerir) ve 50 kg küspe verir (Brar ve ark., 2015).

2.1.1. Şeker pancarının yetiştiği coğrafi konumlar

Şeker pancarı 57 ülkede yetiştirilmektedir. En çok yetiştiği 15 ülke: Rusya Federasyonu, Ukrayna, Amerika Birleşik Devletleri, Almanya, Fransa, Türkiye, Çin, Polonya, Mısır, Birleşik Krallık, İran, Belarus, Hollanda, İtalya ve Belçika'dır. (Kumar ve Pathak, 2013).

2.1.2. Şeker pancarı ve şeker kamışı

Şeker pancarı, şeker kamışından sonra dünyanın en önemli ikinci şeker kaynağıdır (Refat ve Ghaffar., 2010). Şeker pancarı kısa büyüme süresi, yüksek şeker içeriği ve şekerin geri kazanımı gibi pek çok yönden, şeker kamışından daha iyidir

(Pathak ve Kapur, 2013). Şeker pancarı genellikle ılıman iklimde yetişir. Ancak yeni dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi sonucu tropikal ve astropikal bölgeler içinde ekonomik öneme sahip bir bitki haline gelmiştir. Su ve gübreye ihtiyacı şeker kamışından daha azdır ve çeşitli iklim koşullarında yetiştirilebilir (Cosyn ve ark., 2011). Şeker pancarı yaklaşık olarak %90 kök ve %10 hipokotil dokularından meydana gelmektedir ve sakkaroz bakımından zengin bir mahsuldür (Shrivastava ve ark., 2013). Şeker pancarı, şeker kamışı yetiştirilemeyen kurak topraklar için en iyi şeker kaynağıdır. Ayrıca şeker pancarının hasat süresi şeker kamışından farklıdır bu sayede şeker kamışı sezonu bitmesine rağmen şeker üretimi devam edebilir (Sher ve ark., 2019).

2.1.3 Şeker pancarı ıslahı ve genetik yapısı

Genom sekans büyüklüğü yaklaşık 567 megabazdır ve bunun %85'i kromozomlara atanabilir. Genomunun büyük bir bölümünü, yaklaşık %63 olduğu tahmin edilmektedir, tekrar dizileri oluşturmaktadır. Şeker pancarı genomik sekansı, ekonomik olarak alakalı özellikleri etkileyen genlerin tanımlanmasını sağlar, moleküler ıslah çalışmalarını destekler ve bitkinin enerji biyoteknolojisi alanındaki potansiyelini en üst düzeye çıkarır (Dohm ve ark., 2014). Şeker pancarı üreticileri şeker pancarında kök verimini ve şeker içeriğini iyileştirmeye çalışırlar ve bu doğrultuda ıslah yaparlar Ancak bu iki özellik de genetik olarak karışık bir altyapıya sahiptir (Wang ve ark., 2018). Bu durum DNA (deoksiribo nükleik asit) markörleri ile moleküler destekli ıslah çalışmalarını gerekli hale getirmiştir. Şeker pancarında yapılan ıslah çalışmaları sonucunda, şeker miktarı %8'den %18'e ulaşmıştır ve ıslah çalışmalarıyla aynı zamanda viral ve mantar hastalıklarına karşı direnç gibi özellikler de aktif olarak seçilmiştir (Dohm ve ark., 2014). Ekonomik açıdan önemli hastalık ve nematod direnç genlerinin kazanılması yabancı pancar türleri çaprazlanması sonucu elde edilmiştir (Schmidt ve ark., 1994).

2.2. Bitki Islah Çalışmaları

Bitki ıslahı, tarımın gelişmesinde ve insan yaşamının iyileştirilmesinde önemli bir rol oynamıştır. Binlerce yıl önce, yabancı bitki türleri seleksiyonla kültüre edilerek ekinler elde edildi. Yabancı türlerin kültüre edilmesi ve ürün seçilimi, hem insanların temel gıda ihtiyacını karşılar, çeşitli yiyecek imkanı sunar hem de artan ıslah teknolojisi

ile bitkilerin genetik altyapısının gelişmesini sağlar. Bitki ıslahının çeşitli zorlukları vardır: ‘Ebeveynler nasıl seçilir ve üreme popülasyonları nasıl oluşturulur? İstenilen değişkenler nasıl belirlenir ve seçilir? Sonraki nesiller ve değişken ortamlardaki ıslah materyallerinin ifadesini ve performansını doğru bir şekilde tahmin etmek nasıl sağlanır? Daha etkili ve daha verimli seçim nasıl yapılır?’. Ürün yetiştiricileri her zaman bu soruları cevaplamaya çalışır ancak yalnızca geleneksel ıslah yöntemlerini kullanmak pratik değildir (Jiang, 2015).

Bitki ıslahı, yakın geçmişte tarımsal teknolojide meydana gelen gelişmelerle birlikte, örneğin zirai kimyasallar, mahsul veriminin artmasında kayda değer bir ilerleme kaydetmiştir. Buna rağmen bitki yetiştiricileri veya çiftçiler, sürekli olarak pek çok değişime cevap vermelidir. İlk olarak, tarımsal uygulamalar değişmekte, bu da bilimsel tarımın dahil olduğu ve geliştirdiği özelliklere sahip genotiplerin geliştirilmesine duyulan ihtiyacı artırmaktadır. İkinci olarak, hedef ortamlar ve içindeki organizmalar sürekli değişmektedir. Örneğin, mantar ve böcek zararlıları evrimsel olarak sürekli gelişir ve konakladıkları bitkinin sahip olduğu direnci zamanla aşarlar ya da tarımda sürekli olarak yeni arazi alanları kullanılır ve bitkiler değişen ortam şartlarına maruz bırakılır. Ve son olarak da tüketici tercihleri ve gereksinimleri değişir. Bu nedenle bitki yetiştiricileri sürekli olarak yeni mahsul çeşitlerinin geliştirilmesi gibi bir beklentiyle karşı karşıya kalır (Evans, 1997). Artan küresel nüfus, ürün üretiminin de artmasını talep eder ve bazı araştırmalar, ürün verimlerindeki artış oranının azaldığını göstermektedir (Pingali ve Heisey, 1999). Su kıtlığının artması, ekim yapılacak alanın azalması ve ekilebilir alanların çevresel olarak bozulması, kirliliğin artması, patojen ve zararlıların biyotiplerinde yeni ırkların kaçınılmaz olarak ortaya çıkması, olası iklim değişikliğinin olumsuz etkileri gibi durumlar bitkisel üretimdeki bu gerekli artışın gerçekleşmesini zorlaştırırsa da daha gerekli duruma getirmektedir. Tüm bunlar, mahsul verimini artırma görevini bitki yetiştiricileri ve tarım bilimcileri için büyük bir zorluk haline getirmektedir (Collard ve Mackill, 2007).

Genetik faktörler ve fenotip arasındaki ilişki genom ilişkili ıslah çalışmalarını mümkün hale getirmektedir. Bu çalışmalar küresel gıda ihtiyaçlarında sürdürülebilir üretim için daha iyi imkanlar sunmaktadır. Genomda meydana gelen mutasyonların sebep olduğu çeşitliliğin tanımlanması, kalıtsal fenotipik özelliklerin moleküler temelini anlama yönünde önemli bir araçtır (Monteiro ve ark., 2018).

Bitki ıslah çalışmalarında DNA markörleri genetik ıslah çalışmalarına olanak sağlamaktadır. Tohum verimini artırmak için uygulanan markör destekli ıslah

çalışmalarında genoma özgü moleküler markörler kullanılmaktadır. Bir bitki tohumundaki genotipik değişkenlik markör alellerindeki çeşitlilikten kaynaklanmaktadır. Bu durumda moleküler markörler bitki tohum koleksiyonlarını karakterize etmede önemli rol oynamaktadır. (Uncu, 2018). Genetik markörler hem vahşi türlerde hem de ıslah edilmiş türlerde popülasyon yapısının belirlenmesi, genetik çeşitliliğin tespiti, sınıflandırma, bağlantı haritası oluşturma, istenen özellikler için alellerin haritalanması gibi çalışmaların kolaylıkla yapılmasını sağlamaktadır (Simko ve ark., 2012). Moleküler markörler fenotipik ve pedigri verilerine göre daha doğru sonuçlar vermektedir (Smith ve ark., 1992).

2.2.1. Markör destekli ıslah (MAS)

Mevcut verim eğilimleri, öngörülen nüfus artışı ve stres faktörleri göz önüne alındığında, verim ve sürdürülebilirlikle ilgili özellikler bitki ıslah çalışmalarının odağı haline gelmektedir. Hastalığa karşı dirençli, abiyotik stres toleransı, besin ve su kullanım etkinliği ıslah yaparken seçilmek istenen özelliklerdir (Mackill ve ark., 1999; Slafer ve ark., 2005; Trethowan ve ark., 2005).

Geleneksel ıslah çalışmalarıyla verim artışı sağlanabileceği gibi, başarı olasılığını en üst seviyeye çıkarmak için yeni teknolojilere ihtiyaç duyulmaktadır (Ortiz, 1998; Ruttan, 1999; Huang ve ark., 2002). Moleküler genetik ve genomik araştırmalardan elde edilen DNA markör teknolojisi, bitki ıslahı için büyük umut vaat ediyor. Genetik bağlantı sayesinde, bu özelliklerin altında yatan genlerdeki alel varyasyonunun varlığını tespit etmek için DNA markörleri kullanılabilir. Bitki ıslahına yardımcı olmak için DNA markörlerini kullanmak, verimlilik ve direnç büyük ölçüde artırılabilir. DNA markörlerinin bitki ıslahında kullanımı markör destekli ıslah (MAS) olarak adlandırılır ve yeni moleküler ıslah disiplininin bir parçasıdır (Collard ve Mackill, 2007).

Moleküler markör destekli ıslah uygulamaları, DNA markörlerini, bağlantı haritası ve genomik, bitki özelliklerini değiştirmek veya geliştirmek kullanılan genotipik uygulamalardır (Jiang, 2013).

DNA markörlerinin keşfedilmesinin ardından, fenotipik seçilimin yetersiz kalmasıyla klasik ıslah çalışmalarında büyük bir devrim yaşanmıştır. ıslah çalışmaları, ilgilenilen genlerle bağlantılı markörlerle yapılmıştır. Markör destekli ıslah tekniği, DNA markörü ile spesifik bir gen arasında var olan bağlantı dengesizliği durumuna

dayanır. Markör destekli ıslah, birkaç önemli genin bir çeşitte birleştirilmesi yani gen piramidi için büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak, bu ıslah türü, ıslah projesinin süresini kısaltmaz çünkü seçilen bitkilerin sahada test edilmesi ve değerlendirilmesi gerekir. Ve değerlendirme süresinin uzunluğu her bir bitkinin yetiştirme süresine bağlıdır (Ben-Ari ve Lavi, 2012).

İstenilen özellikle ilgili gen veya genleri markörlerle tanımlayabilmek için, DNA markörleri ile bağlantı analizleri yapılır. Markör destekli ıslah çalışmasının başarılı olabilmesi ve daha iyi sonuçlar alabilmek için markörlerin kalitesi ve sayısı önemlidir. Markörün kalitesi, maliyeti ve genotipleme kabiliyeti ile ilişkilidir. Sayısı ise markör ile gen arasındaki ilişkiyi ve doğruluğu etkiler. Yani çok sayıda markörün olması, istenilen geni spesifik bir şekilde elde etme veya kontrol etme durumunu artırır (Martin ve ark., 1993, 1994; Okada ve ark., 2010; Udagawa ve ark., 2010; Yang ve ark., 2010). Moleküler markörler istenilen bir genle ilişkilendirildikten sonra büyük bir popülasyondan istenilen hatları seçmek için kullanılabilir (Varshney ve ark., 2009).

2.2.3. Genetik markörler

DNA markörleri, bir popülasyondaki veya gen havuzundaki belirli bir DNA sekansı için bir genin farklı genotipleri veya alelleri arasındaki polimorfizmi tespit etmek için kullanılabilen mutasyonları veya varyasyonları açığa çıkaran DNA bölgeleri olarak tanımlanır. Bu gen bölgeleri genom içindeki belirli bir yer ile bağlantılıdır ve moleküler teknolojiler sayesinde tespit edilebilir. Kısaca, bir DNA markörü farklı bireyler arasında polimorfizmi gösteren küçük bir DNA sekans bölgesidir (Jiang, 2013).

Genetik çeşitlilik ve fenotipik çeşitlilik uzun yıllardır bitki ıslahı konusunda ilgi çeken konular olmuştur. RFLP (restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi) markörlerin keşfi DNA düzeyindeki polimorfizmlerin nicel, doğru ve genom çapında değerlendirilmesine olanak sağladığı için bu alanda devrim yaratmıştır. DNA markörleri bitkiler, hayvanlar, insanlar ve diğer organizmalarda MAS (markör destekli ıslah) çalışmaları için kullanılırlar. Yeni teknolojilerin gelişmesi sonucu onlarca markör sınıfı geliştirilmiştir. İdeal DNA markörün özellikleri şöyledir:

- Yüksek polimorfizm oranı ve analiz edilen fenotipleri belirleyebilmeli,
- Markörler ve ilgilenilen genler arasındaki bağlantıyı belirleyebilmek ve çözünürlüğü yüksek genetik haritalar oluşturabilmek için genomda oldukça bol ve düzgün dağılmış olmalı,

-İlgili fenotipi spesifik bir genin aleliyle ilişkilendirebilmek için ko-dominant (heterozigot olma durumunu ayırt etme yeteneği) özellik göstermeli,

-Çok sayıdaki bireyin çok sayıda lokusunun kolayca genotiplenmesine elverişli olmalı ve makul bir fiyat aralığında olmalı.

-Yapılan çalışmalarda her zaman birden çok genotipin tam dizilenmesi mümkün olmadığı için, DNA markörleri alternatif olarak kullanılabilir. Ayrıca sekanslama metodlarının geliştirilmesi ve iyileştirilmesine yönelik harcanan çabalar DNA ve genom bilgisi hakkında umut vaat edicidir (Ben-Ari ve Lavi, 2012).

AFLP, RAPD, SSR markörleri kullanılan, markör yoğunluğu ve genetik uzaklık bakımından yetersiz genetik haritalar, markör destekli ıslah çalışmalarını kısıtlamaktadır (Wang ve ark., 2018).

2.2.3.1. RFLP markörleri (Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi)

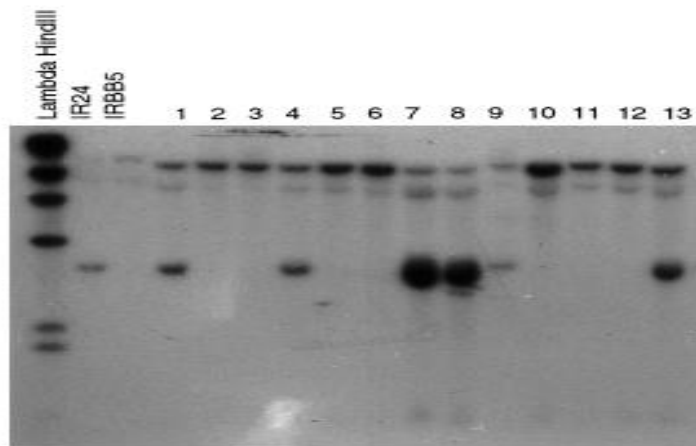
RFLP markörleri tek lokus markörleridir ve ko-dominant kalıtılırlar. Keşfedilen ilk DNA markör çeşididir ve markör destekli ıslah çalışmalarına büyük ölçüde katkı sağlamıştır. Yapılan pek çok çalışmada yıllarca RFLP markörleri kullanılmıştır. Restriksiyon bölgesindeki nokta mutasyonlarını analiz etmede kullanılır ve polimorfizm oranı düşüktür. Bu sebeple diğer DNA markörleri daha popüler hale gelmiştir. Genetik olarak yakın olan çeşitli türleri genotipleme kabiliyetinden dolayı RFLP hala bazı çalışmalarda uygulanır (Ben-Ari ve Lavi, 2012).

RFLP markörü genellikle DNA molekülünün kodlanmayan bölgelerinde meydana gelen nokta mutasyonları nedeniyle oluşur. Genomda var olan polimorfizmlerin sonucunda restriksiyon endonükleazlar için tanıma alanları oluşur. Restriksiyon enzimlerinin DNA'yı kesmesi sonucunda değişken uzunluklarda karakteristik bant oluşturan DNA fragmanları meydana gelir (Forrester ve ark., 2016).

RFLP markörlerin prensibi, herhangi bir genomik DNA'nın, restriksiyon enzim bölgelerinin varlığına veya yokluğuna göre ayırt edilebilmesidir. Restriksiyon enzimleri belirli bir alanı tanır ve keserler. Genomik DNA' da tek nükleotit mutasyonlarının birikmesi nedeniyle, DNA üzerindeki restriksiyon enzim bölgeleri değişir, bu da birbiriyle yakından ilişkili iki genomun restriksiyon bölgelerinde fark oluşturur. Oluşan restriksiyon modeli southern blot tekniği kullanılarak tespit edilebilir (Saraswathy ve Ramalingam, 2011).

DNA molekülünü belirli bölgelerden kesen, restriksiyon bölgeleri adı verilen ve değişken uzunluklarda farklı parçalar elde edilmesini sağlayan restriksiyon enzimleri kullanılır. Elektroforez ile ayrıldıktan sonra, fragmanlar southern blot tekniğiyle nitroselüloz veya naylon filtrele aktarılır ve radyoaktif olarak işaretlenmiş DNA problemleri ile hibridizasyon ve fotografik film kullanılarak görsel veri elde edilir (Sorof Uddin ve Cheng, 2015).

Özet olarak, DNA bir restriksiyon enzimi ile kesilir, elde edilen fragmanlar, bir agaroz jel üzerinde ayrıştırılır veya southern blot analizi yapılır ve bir proba hibridize edilir. Spesifik problemler genellikle genomik veya cDNA kütüphanelerinden elde edilir. Her bant belirli bir boyuta sahip bir aleli temsil eder ve baz çifti (bp) olarak ölçülür. Restriksiyon bölgesinin var veya yok temsili ile analiz edilir. Bir RFLP markörü genellikle her lokusta iki alel içerir ve bu nedenle düşük polimorfizm seviyesine sahiptir (Ben-Ari ve Lavi, 2012).



Şekil 2.1. RFLP markör örnek görüntüsü (Huang ve ark., 1997).

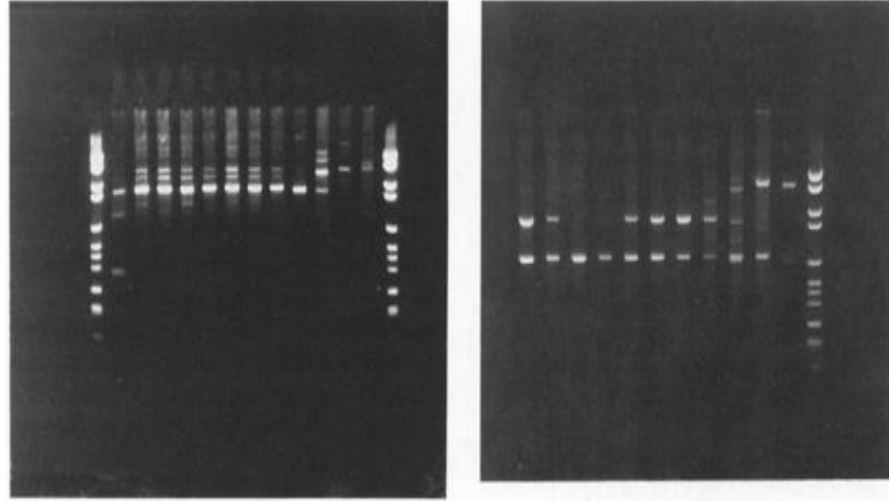
2.2.3.2. RAPD (Rastgele çoğaltılan polimorfik DNA) markörleri

İslah çalışması yapabilmek için popülasyon içinde ve popülasyonlar arasındaki genetik çeşitlilik bilgisine sahip olmak gerekir (Hetzl ve Drinkwater, 1992). DNA polimorfizmlerini tespit edebilen bir başka teknik olan RAPD markörleri, kısa oligonükleotit primerleri ile DNA segmentlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile rastgele çoğaltılmasına dayanır ve PCR reaksiyonu düşük sıcaklıkta gerçekleştirilir (Williams ve ark., 1990). Rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA-PCR (PCR-RAPD) diye adlandırılana bu teknik, çeşitli hayvan ve bitki türlerinin genetik çalışmalarında başarıyla

uygulanmıştır (Michelmores ve ark., 1991; Welsh ve McClelland, 1991; Baird ve ark., 1992; Chapco ve ark., 1992). Farklı primerler farklı polimorfik markörler üretirler. Çeşitlilik, primer bağlanabilen veya bağlanamayan nokta mutasyonlarından kaynaklanabileceği gibi bağlanma bölgelerinin arasındaki boşluktaki farklılıklardan da kaynaklanabilir. DNA parmak izi çalışmalarında heterozigot olma durumunu homozigot olma durumundan ayırt edememesi bu tekniğin bir dezavantajıdır. Bununla birlikte, birçok RAPD polimorfik lokusunun, sekans bilgisi olmadan geliştirilebilmesi ve sonuçların agaroz jelde doğrudan görüntülenmesi bu tekniği, farklı popülasyonlardaki genetik farklılıkları tespit etmek için uygun hale getirir (Gwakisa ve ark., 1994).

RAPD markörleri multiallelik markörlerdir ve dominant kalıtım gösterirler. Bu tekniğin en büyük avantajı genotipleme çalışması yapmanın basit olmasıdır. Bu nedenle RAPD birçok laboratuarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tekniğin temel dezavantajları; düşük seviyede polimorfizm, markör destekli ıslah çalışması için daha az kullanılan dominant kalıtım şekli ve düşük güvenilirliktir. RAPD primerleri, polimorfizmi saptamak amacıyla normal PCR primerlerinden yaklaşık 16-22 nükleotit daha kısadır. Öte yandan yaklaşık 10 nükleotit uzunluğunda kısa primerler çok hassa PCR reaksiyonları gerçekleştirir ve sonuç olarak tekrarlanan PCR sonuçları her zaman aynı değildir (Ben-Ari ve Lavi, 2012).

Toplam DNA, 10 nükleotitlik rastgele primer kullanılarak çoğaltılır ve elde edilen fragmanlar, agaroz jel üzerinde boy uzunluğu bakımından ayrılmış durumdadır. Primer ve kalıp DNA arasındaki eşleşme, belirli bir bandın oluşmasını sağlar. Kalıp DNA'da var olan herhangi bir mutasyon, primerin DNA ile hibridizasyonunu önleyerek bandın oluşmamasına yol açar. RAPD markörü genellikle her bir lokusta iki alel içerir, bir bandın varlığı veya yokluğu (Ben-Ari ve Lavi, 2012).



Şekil 2.2. RAPD markör agaroz jel görüntüsü (Wilkie ve ark., 1993).

2.2.3.3. AFLP (Çoğaltılmış fragman uzunluğu polimorfizmi) markörleri

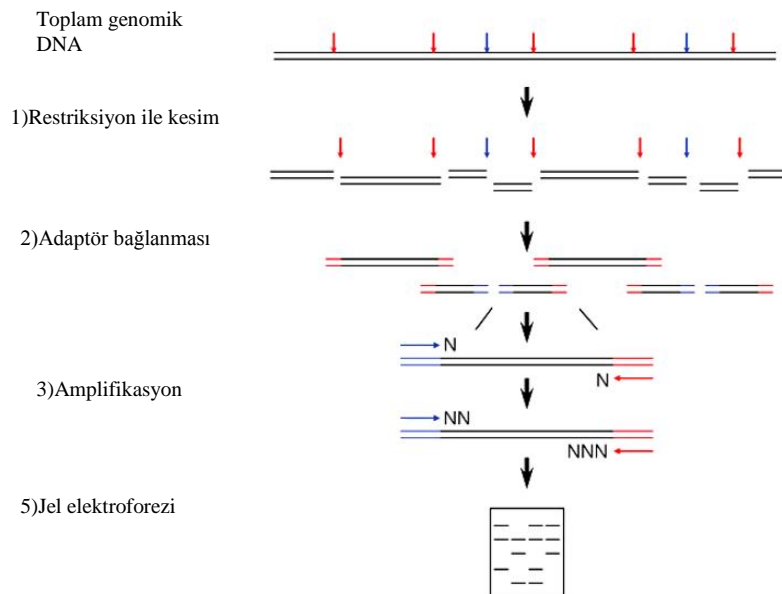
Bu markör yöntemi bilgilendirici ve uygun maliyetli DNA parmak izi yöntemlerinden biridir (Bonin ve ark., 2005). AFLP polimorfizmleri, özellikle bir organizmanın genomu veya genetiği hakkında çok az şey bilindiğinde, genotipleme için etkili bir yol sağlar. Restriksiyon enzimleri DNA'yı keser ve adaptörler fragmanların uçlarına bağlanır. Ardından PCR ile çoğaltma işlemi yapılır ve elde edilen bant boyları jelde veya kılcal elektroforezde görüntülenir. Bu yöntem genetik polimorfizmleri tespit etmek için oldukça hassastır, ancak yüksek miktarda ve yüksek kalitede DNA'ya ihtiyaç duyar (Foster ve ark., 2011).

AFLP markörü multi-lokus bir markördür ve dominant kalıtım gösterir. Genotipleme teknolojisi oldukça basittir. Bu sistemin temel avantajları, genotiplemenin kısmen kolay olması, her reaksiyonda tespit edilen yüksek lokus sayısı ve sistemin güvenilirliğidir. En büyük dezavantajları ise, düşük polimorfizm düzeyi ve markör destekli ıslah çalışmaları için daha az uygun olan dominant kalıtım şeklidir. (Ben-Ari ve Lavi, 2012). Ancak, AFLP markörlerinin DNA metilasyonunun tespitine (metilasyona duyarlı ve metilasyona dirençli) restriksiyon enzimleri kullanılarak uygulanması dikkat çekicidir (Mueller ve Wolfenbarger, 1999; Meudt ve Clarke, 2007).

Bir AFLP primeri yaklaşık 17-21 primer uzunluğundadır ve sentetik adaptör sekansı, restriksiyon endonükleaz tanıma sekansı ve dejenere olmayan rastgele seçici bir diziden oluşur. İlk olarak, iki restriksiyon enzimi ile genomik DNA kesilir. Bu kesimlerden biri 6 baz çifti tanıma bölgesine sahip EcoRI, PstI veya HindIII

kullanılarak gerçekleştirilir ve 4 baz çifti tanıma bölgesine sahip MseI veya TaqI enzimlerinden biri kullanılarak diğer kesim işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra adaptörler PCR reaksiyonu ile sekansları çoğaltmak için kesilen parçaların her iki ucuna bağlanır. Çift iplikli oligonükleotit adaptörlerinin, restriksiyon bölgesindeki ligasyon işleminden sonra yapısı bozulur ve tekrar kullanılamaz. Böylece sadece restriksiyon enzimleri tarafından kesilen bölgeler çoğaltılmış olur. AFLP ürünleri yüksek çözünürlüklü elektroforez sistemlerinde incelenebilir. AFLP deneyleri aynı zamanda küçük miktarda ki DNA örnekleri için de uygundur. Yüksek genotipleme verimine sahiptir ve laboratuvarlar arasında tekrarlanabilir. Diğer bir avantajı, önceden dizi bilgisi gerektirmemesi ve farklı türler için bazı durumlarda aynı primer setinin kullanılabilmesidir. Bu durum, özellikle DNA markörleri az bulunduğu zaman kullanışlıdır. Bununla birlikte, bu yöntemin bazı dezavantajları mevcuttur. Restriksiyon enzimi ile kesim yapabilmek için yüksek kalitede DNA gereklidir. AFLP markörleri genellikle büyük genomlu bazı türlerde sentromer bölgelerinde yoğunlaşmış durumdadır, arpa gibi (Jiang, 2015).

Her bir bandın var veya yokluğunu belirlemek için bant paterni 1/0 matrisine dönüştürülür. Polimorfizm, bir restriksiyon bölgesinin veya PCR'de tespit edilen nükleotid polimorfizminin varlığı veya yokluğu şeklinde analiz edilir. Bir AFLP bandı genellikle her bir lokus için iki alel içerir (belirli bir bandın varlığı veya yokluğu) (Ben-Ari ve Lavi, 2012).

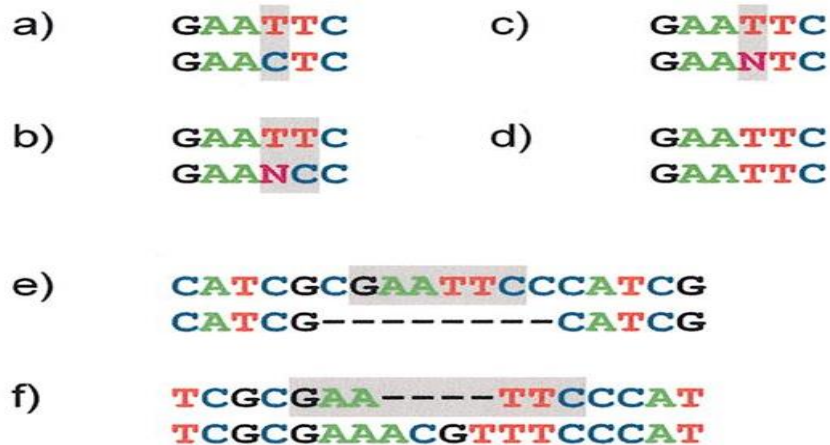


Şekil 2.3. AFLP markör örnek görüntü (Chial, 2008).

2.2.3.4. SNP (Tek nükleotit polimorfizmi) markörleri

Tek nükleotit polimorfizmi(SNP), kısa bir yan dizilim sekansının bilindiği bir nokta mutasyonudur ve bir nükleotitte bir değişiklik meydana gelmesi sonucu oluşur. Ko-dominant kalıtım gösterir. DNA sekanslama yöntemlerinin kullanımı, kütle spektrometresi gibi yöntemler SNP genotipleme için kullanılabilir. Yeni nesil dizileme teknolojileri SNP markör keşfi için uygun araçlardır. Her alel, DNA dizisinde var olan nükleotit ile tanımlanır. SNP'ler tek bir nükleotitin genomdaki herhangi bir yerde herhangi bir şekilde değişmesi sonucu meydana gelen nokta mutasyonları sonucu oluşur. Değişiklikler bir nükleotidin bir başkasıyla değiştirilmesi ve/ veya tek bir nükleotidin silinmesi veya eklenmesi (indels) şeklinde olabilir. SNP'ler tek lokus markörleridir ve her lokusta iki alele sahiptir (Ben-Ari ve Lavi, 2012).

Tek nükleotit polimorfizmleri en yaygın genetik varyasyon türüdür. Her bir SNP nükleotit olarak adlandırılan tek bir DNA yapı bloğundaki bir farkı temsil eder. Örneğin, bir SNP, belirli bir DNA dizisindeki nükleotit sizozinini (C), nükleotit timin (T) ile değiştirebilir. Yaygın olarak DNA'da genler arasında bulunur. SNP'ler bir gen içinde veya bir genin yanındaki düzenleyici bölgede meydana geldiğinde, genin fonksiyonunu etkileyerek meydana gelen genetik çeşitlilikte doğrudan rol oynayabilir (Pratt ve ark., 2014).



Şekil 2.4. SNP Markör oluşumu (Thiel ve ark., 200)

2.2.3.5. SSR (Basit Dizi Tekrarları) / Mikrosatelit mark örleri

SSR markörleri, bitki genetiği ve ıslahında önem kazanmış ve yaygın kullanılan markörlerdir. Çok çeşitlilik, multi-alelik doğası, ko-dominant kalıtım, tekrarlanabilirlik, genomda bol miktarda bulunma, geniş genom kapsamı (mitokondri ve kloroplast genomları dahil) ve yüksek verimli genotiplendirme gibi pek çok olumlu özellik bu markör çeşidini önemli hale getirmiştir (Parida ve ark., 2009).

Mikrosatelitler (Litt ve Luty, 1989), kısa ardışık tekrarlar (STR'lar) (Edwards ve ark., 1991), basit dizi tekrarları (SSR'lar) (Jacob ve ark., 1991) olmak üzere değişik birden fazla şekilde adlandırılabilirler. SSR'lar bugüne kadar analiz edilen tüm prokaryotik ve ökaryotik genomlarda sıkça rastlanan, yaklaşık 1-6 baz çifti uzunluğunda ardışık tekrarlanan motiflerdir (Zane ve ark., 2002). Bitkiler A-T tekrar motifleri bakımından zengin canlılardır (Powell ve ark., 1996). SSR markörleri hem kodlanan hem de kodlanmaya gen bölgelerinde, genom boyunca dağılmış halde bulunur. SSR bölgelerindeki farklı tekrarlar sonucu yüksek uzunlukta polimorfizm oluşur ve böylece PCR reaksiyonu ile kolayca ve tekrarlanabilir şekilde tespit edilebilirler. Bu markörler yüksek verimli genotiplemeye elverişlidir ve babalık analizi, yüksek çözünürlüklü genom haritalarının oluşturulması, faydalı genlerin haritalanması, markör destekli ıslah ve genetik ve evrimsel ilişkilerin kurulması için oldukça değerli bir araçtır (Parida ve ark., 2009). Var olan tekrarların kopya sayısı bireyler arasında değişmektedir ve bu durum polimorfizmin kaynağıdır (Jiang, 2015).

Genomik SSR'ların çoğu nükleerdir, ancak mitokondri ve kloroplastta da bulunur. Genomda bulunduğu bölgeye bağlı olarak, nükleer (nuSSR), mitokondriyel (mtSSR), veya kloroplastik (cpSSR) olarak sınıflandırılır (Kalia ve ark., 2011).

SSR'lar tek lokus markörleridir ve her lokusta bir ile on veya daha fazla alel bulundurur ve böylece oldukça yüksek polimorfizme sahiptirler. SSR markörleri ko-dominant kalıtıma sahiptirler ve böylece heterozigot olma durumunu homozigot olma durumundan ayırabilirler. Yani bu markörlerin temel avantajı yüksek düzeyde polimorfizm ve güvenilirlikleridir (Ben-Ari ve Lavi, 2012).

2.3. Yeni Nesil Dizileme Yöntemleri ile Markör Geliştirilmesi

Genetik çeşitliliğin tespiti ve kullanımı, her zaman bitki ıslahının ayrılmaz parçası olmuştur. DNA temelli moleküler markörler, tohum koleksiyonlarında ve ıslah

yapılan hatlarda var olan çeşitliliği saptamak için kullanılır. Son yirmi yılda, önemli bitki türleri için çok sayıda moleküler markör geliştirilmiştir. Bu markörler, genetik ve fiziksel haritaların geliştirilmesinde ve markör destekli ıslah için ekonomik öneme sahip özellikleri kontrol eden genlerin belirlenmesinde kullanılmıştır (Varshney ve ark., 2005; Varshney ve ark., 2006). Genomik destekli ıslah, farklı genom stratejileri ve araçlarını kullanan kapsamlı bir yaklaşımdır (Varshney ve ark., 2005). Farklı genomik araçlar ve stratejiler kullanılarak fenotipin genotip üzerinden analiz edilmesi, genom destekli ıslahın temelidir (Varshney ve ark., 2006). Genotipten fenotipin öngörülmesinin kesinliğini ve verimliliğini artırarak, biyotik ve abiyotik streslere karşı arttırılmış direnç veya tolerans ile geliştirilmiş bitki çeşitlerinin yetiştirilmesi büyük ölçüde hızlandırılabilir (Varshney ve ark., 2009).

2.3.1. Yeni nesil dizileme yöntemleri

Genomik DNA, türleri ve bireyleri tanımlar. Bu durumda DNA sekansı hücrelerin yapısını ve fonksiyonlarını araştırmak için büyük önem taşır (Church ve Gilbert, 1984). DNA dizileme teknolojileri moleküler klonlama, ıslah çalışmaları, patojenik gen bulma ve karşılaştırmalı evrim çalışmaları gibi çalışma alanlarında bilim insanlarına katkı sağlar (Liu ve ark., 2012).

Yeni nesil dizileme, bitki genetiği ve ıslahı için önemli etkilere sahiptir. Transkripsiyon ve sekans verileri, moleküler markörler, genetik ve fiziksel haritalar dahil olmak üzere geniş ölçekli genomik kaynakların geliştirilmesi, diğer potansiyel uygulamalara ek olarak önemlidir (McPherson, 2009). Yeni nesil dizileme teknolojisini kullanarak transkriptom ve genom dizilimi, bitkilerden elde edilen veriyi artırmaktadır. Dahası, yeni nesil dizileme teknolojileri ile geliştirilen çok sayıda genetik markörün bulunması, özellikle haritalamayı kolaylaştırmakta ve markör destekli ıslahı daha mümkün kılmaktadır. Örneğin, yeni nesil dizileme kullanan moleküler markörlerin büyük ölçekli gelişimi, markör verimsiz ürünlerde, markör destekli ıslah (MAS) için pratik kullanımda olan bağlantı haritalamasını ve tüm genom dizileme (WGS) bazlı ilişki genetiğini kolaylaştırabilir. Geniş popülasyonlarda çok sayıda aday gen için üretilen havuzlanmış genomların dizilimi, popülasyon biyolojisini daha iyi anlama ve genom genetik ilişki genetiği çalışma olanakları sunar (Varshney ve ark., 2009; Treangen ve Salzberg, 2012).

2.3.1.1. Dizilemenin keşfedilmesi ve geliştirilmesi

1977’de Frederick Sanger, zincir sonlandırma yöntemine dayanan aynı zamanda Sanger Dizileme olarak da bilinen DNA dizileme teknolojisini geliştirdi. Ardından Walter Gilbert, DNA’nın kimyasal modifikasyonuna ve daha sonra belirli bazlarda bölünmeye dayanan başka bir dizileme teknolojisi geliştirdi. Yüksek verim ve düşük radyoaktivite nedeniyle, Sanger Dizilimi, laboratuvar ve ticari dizileme uygulamalarının öncül teknolojisi olarak kabul edilmektedir ve ‘birinci nesil teknoloji’ olarak kabul edilmektedir. O zamanlarda DNA dizilimi zahmetli ve radyoaktif maddeler kullanılan bir uygulamaydı. Yapılan iyileştirme çalışmalarının ardından 1987 yılında Applied Biosystems ilk otomatik dizileme makinesini tanıttı ve dizilemeyi daha hızlı ve daha doğru hale getiren kılcal elektroforezi kullandı. 1998’de geliştirilen otomatik sekanslama makineleri ve Sanger dizileme teknolojisi ile kapiler sekanslama makinelerini birlikte kullanan bilgisayar programı, 2001’deki insan genom projesinin tamamlanabilmesi için en önemli ara çhaline geldi (Collins ve ark., 2003).

Yeni nesil dizileme yöntemleri, eş zamanlı ve büyük miktarda analiz yapabilme, yüksek verim ve düşük maliyet yönünden Sanger yönteminden farklıdır. İnsan genom projesinin ardından 454, SOLID, illumina gibi yeni nesil dizileme yöntemleri geliştirildi ve cihazlar piyasaya sürüldü. Sanger yöntemiyle karşılaştırıldığında ise verim, doğruluk ve maliyette iyi bir performans elde edildi. Ardından devam eden iyileştirme ve gelişmeler neticesinde, okuma uzunluğu, doğruluk, kullanılan malzemeler, insan gücü gereksinimi, biyoinformatik altyapı gibi konularda daha iyi performans ve avantajlar ortaya çıkmıştır (Liu ve ark., 2012).

2.3.1.2. Sanger dizileme

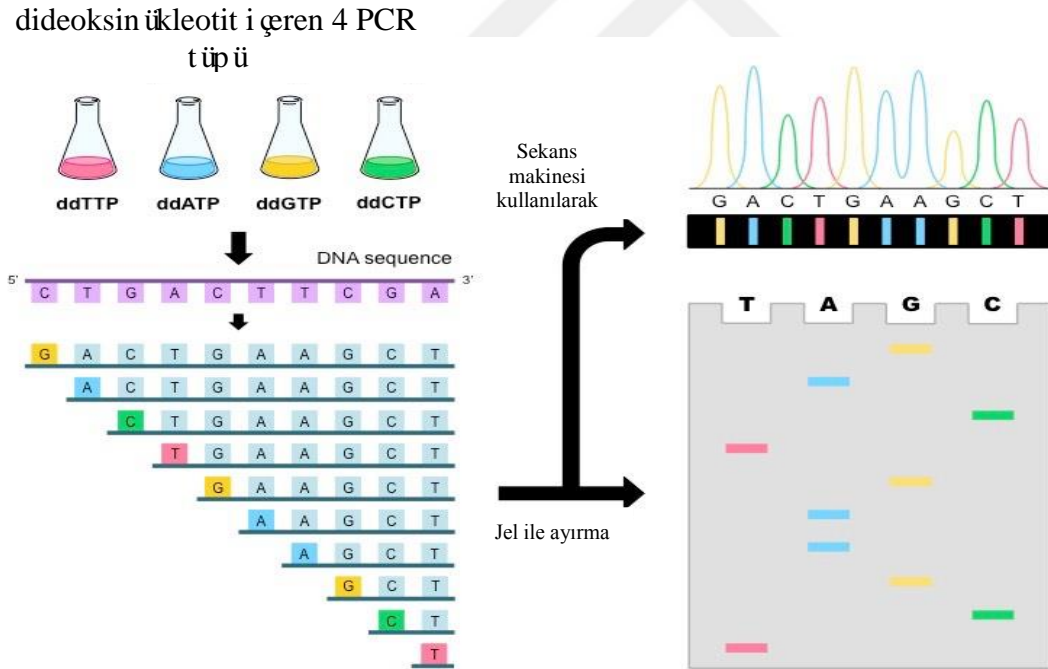
Sanger dideoksi sekanslama (Sanger ve ark., 1977) ve modifikasyonları (Prober ve ark., 1987; Madabhushi, 1998) yaklaşık 30 yıl boyunca DNA dizileme alanını domine etti ve 10 yılda Sanger dizi okumalarının uzunluğu 450 bazdan 1 kb'nin üzerine çıktı (Varshney ve ark., 2009).

Sanger dizilemesinin sınırlamaları şunlardır:

-Taramadan önce uzama ürünlerinin boyutuna göre ayrılması gerekliliği ve her örnek için bir kapiler veya jel görüntüsü gerektirmesi,

-Büyük miktarda dizilemeler için Escherichia coli'yi kullanarak DNA'nın klonal popülasyonlarını üretme ihtiyacı.

İkinci madde, PCR bazlı yöntemler kullanılarak potansiyel olarak azaltılabilir. Bireysel reaksiyon maliyetleri azaltılmış reaksiyon hacimlerinde sıralama reaksiyonları gerçekleştirerek azaltılabilir, ancak temel Sanger dizilişinin maliyetini azaltmaya yönelik kısıtlamalar, teknolojik sınırlardan kaynaklanmaktadır. Mikroakışkanlar, nanoteknoloji ve bilişim alanlarında yapılan ilerlemelerle, DNA dizilişinin hızla ve/veya üretimini artıracak alternatif teknolojiler ortaya çıkmıştır. Yeni nesil dizileme terimi, insan genomunu sıralama potansiyeline sahip Sanger dizilimi dışındaki teknolojileri kolektif olarak tanımlamak için kullanılır. Roche / 454, Solexa / Illumina ve AB SOLiD gibi ticari olarak temin edilebilen yeni nesil dizileme teknolojileri, Sanger dizilemesinin sınırlayıcı faktörlerini atlatma potansiyelini şimdiden göstermiştir (Smailus ve ark., 2005).

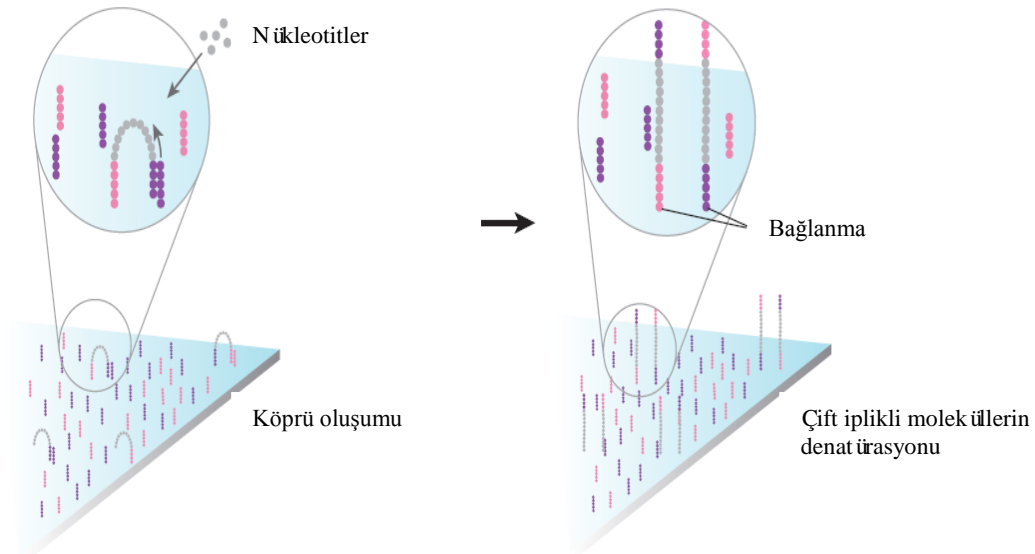


Şekil 2.5. Sanger dizileme modeli (Online Biology, Sanger's method of gene sequencing).

2.3.1.3. Illumina dizileme

Bu sekanslama yaklaşımı ile DNA fragmanları, akış hücresi adı verilen katı bir substrata hibritlenir. Köprü amplifikasyonu olarak adlandırılan bir işlemde, bağlı DNA şablon fragmanları, kalıbın kopyalarının orijinalin yakınına oluşturulduğu izotermal bir

reaksiyonda amplifiye edilir. Bu, akış hücresindeki DNA fragmanlarının kümelerinin, bağlı tek iplikli DNA moleküllerinin bir "köprü" meydana getirmesiyle sonuçlanır. Moleküller akış hücresinin yeni bir parçalanabilir floresan nükleotid sınıfı ve DNA polimerizasyonu için gerekli olan reaktifler ile taşmasıyla dizilir. Her şablonun tamamlayıcı bir ipliği, floresan olarak etiketlenmiş nükleotidler kullanılarak bir defada bir baz sentezlenir. Floresan molekülü bir lazer tarafından uyarılır ve ışığı yayar, rengi dört bazın her biri için farklıdır. Floresan etiket daha sonra parçalanır ve yeni bir polimerizasyon turu meydana gelir. 454 dizilemeden farklı olarak, polimerizasyon adımı için dört baz da mevcuttur ve sadece tek bir çevrim başına molekül eklenmiştir. Illumina'dan gelen HiSeq2500 dizilim enstrümanı, 100 nt ve% 0.1 hata oranıyla, çalışma başına 600 GB'a kadar üretebilir. Illumina tekniği, bir çift parçalı okuma olarak adlandırılan bir DNA fragmanının karşıt uçlarından sekans üretebilir. Reaktif maliyetleri, çalışma başına yaklaşık 23.500 \$'dır (Aird ve ark., 2011; Liu ve ark., 2012; Ben-Ari ve Lavi, 2012).



Şekil 2.6. Illumina dizileme modeli (Hawai'i Institute of Marine Biology, Illumina Sequencing Overview).

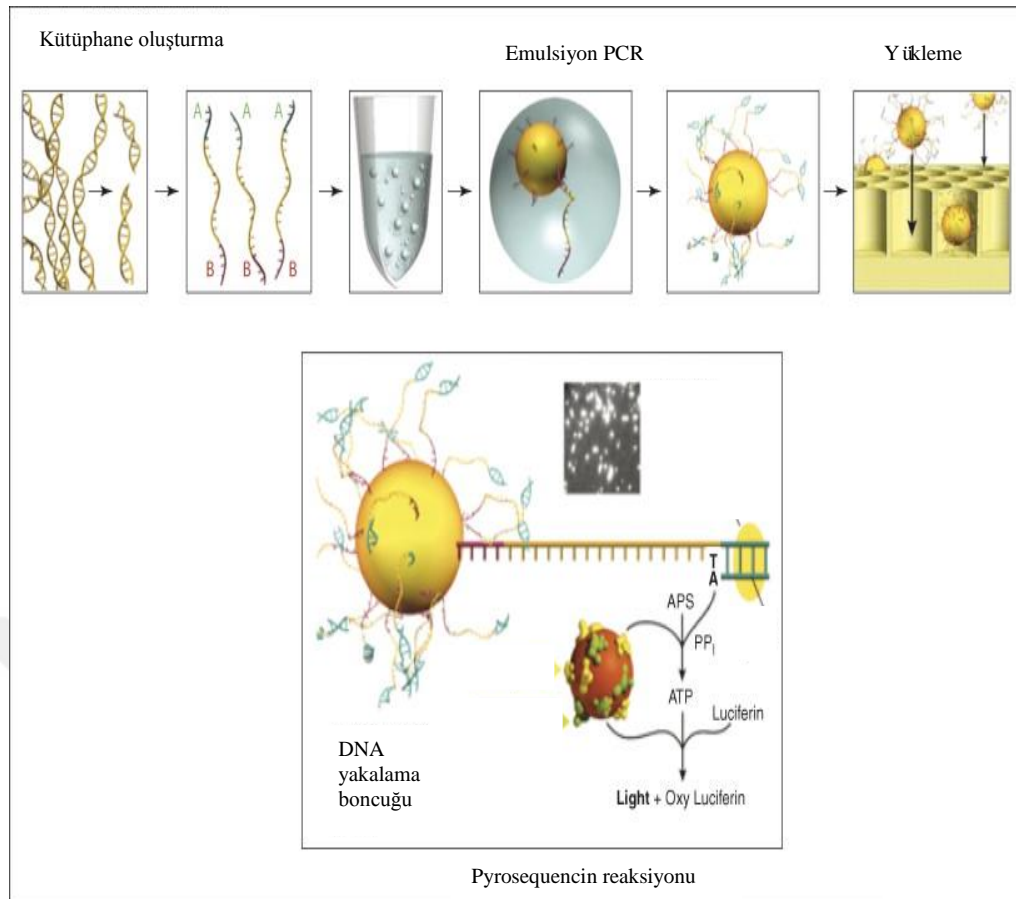
2.3.1.4. Roche 454 dizileme

Roche 454, ticari olarak başarılı ilk yeni nesil sistemdir. Bu dizileme yöntemi pyrosequencing teknolojisini kullanır. Pyrosequencing teknolojisi, zincir uzamasını sonlandırmak için dideoksitler kullanmak yerine, nükleotit eklenmesi sırasında açığa

çıkan pirofosfatın tespitine dayanır (Liu ve ark., 2012). Onu ticarileştiren şirketin adından sonra 454 sıralaması olarak adlandırılmıştır.

Genomik DNA (cDNA kütüphanesi de kullanılabilir), izole edilir, parçalara ayrılır, adaptörlere bağlanır ve tek zincirli hale getirilir. Her bir parçacık bir boncuğa bağlanır (Ben-Ari ve Lavi, 2012). Tek bir DNA fragmanının bir yakalama boncuk dizisine hibritlendiği ve boncukların tek tek bağlı şablonu amplifiye etmek için gerekli olan ajanlar ile emülsiyon haline getirildiği bir SBS (sentezleme ile sekanslama) yöntemidir. Emülsiyondaki her bir boncuk, orijinal şablonun milyonlarca kopyasının üretildiği ve yakalanan boncuklara bağlandığı bağımsız bir PCR gibi davranır ve daha sonra takip eden dizileme reaksiyonu için şablon görevi görür. Tek tek boncuklar, DNA polimerazı, primerleri ve sekanslama sırasında üretilen inorganik fosfatın tüketimi yoluyla floresan oluşturmak için gerekli enzimler ile birlikte bir plakaya yerleştirilir. Cihaz, sıraya göre her bir DNA bazında plakayı yıkar. DNA polimeraz ile bir bazın şablona spesifik birleşmesi meydana geldiğinde, bir pirofosfat (PPi) üretilir. Bu pirofosfat, PPi'nin ATP'ye dönüşmesini takiben bir ışık sinyalinin oluşturulması yoluyla bir enzimatik lüminometrik inorganik pirofosfat saptama analiziyle tespit edilir. Böylece, mevcut nükleotidlerin, boncuk üzerinde meydana gelen sekanslama reaksiyonu ile birleştirildiği kuyucuklar, eklenen nükleotidlerin sayısı ile orantılı bir ışık sinyali yayarken, nükleotidlerin dahil edilmediği kuyucuklar bunu yapmaz. Cihaz, dizileri uzatmak için ardışık nükleotid yıkama işlemini yüzlerce kez tekrarlar (Tedersoo ve ark., 2010; Liu ve ark., 2012; Metzker, 2009).

454 GS FLX Titanyum XL + platformu, 23 saatlik bir çalışmada, 700MB'a kadar 750 bp değerinde ham kaynak üretir. Teknolojinin, ekleme / çıkarma ile sonuçlanan homopolimerleri ölçmede zorluğu ve yaklaşık% 1'lik bir genel hata oranı vardır. Reaktif maliyetleri, çalışma başına yaklaşık 6,200 dolardır.



Şekil 2.7. Roche 454 dizileme modeli (Mardis, 2008).

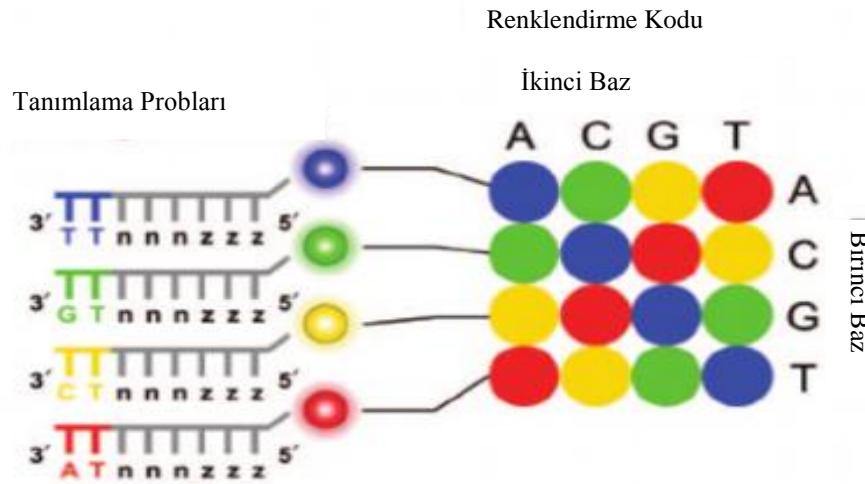
2.3.1.5. ABI Solid Dizileme

SOLiD sistemi Harvard Tıp Okulu ve Howard Hughes Tıp Enstitüsü tarafından ortaklaşa geliştirildi. SOLiD' deki preparasyon, DNA şablonu, boncuklar, primerler ve PCR içeren mikro reaktörlerde klonal boncuk popülasyonlarının hazırlandığı Roche / 454'e çok benzer bileşenler içerir. Emülsiyon PCR ile büyütülmüş PCR ürünlerini içeren boncuklar, tescilli bir süreçle zenginleştirilir. Boncukların üzerindeki DNA şablonları, cam tabakaya bağlanmayı sağlamak için 3' ucunda değiştirilir. Bir primer DNA şablonundaki bir adaptöre bağlanır ve akış hücresine floresan olarak etiketlenmiş oligonükleotidlerin bir karışımı elde edilir. Oligonükleotid, şablon sekansı ile eşleştiğinde, primer üzerine bağlanır ve birleştirilmemiş nükleotitler, yıkanır. Şarjlı bir çift cihaz kamerası, primere eklenen farklı renkleri yakalar. Her bir floresan dalga boyu belirli bir dinükleotid kombinasyonuna karşılık gelir. Görüntü yakalandıktan sonra, floresan etiket çıkarılır ve DNA ligasyonunun bir sonraki turuna başlamak için akış hücresine yeni oligonükleotit seti enjekte edilir. SOLiD- 5500x1 platformundaki bu

sıralama-bağlama yöntemi, her biri için% 0.01 hata oranı ve çalışma başına yaklaşık 10.500 \$ 'lık reaktif maliyeti ile her biri 75 + 35 nt'a kadar 1.410 milyon okuma üretir. Yaygın olarak kabul edilmesine ve kullanılmasına rağmen, yeni nesil dizileme platformları, PCR ile ortaya çıkan amplifikasyon önyargılarından muzdariptir ve değişkenlik nedeniyle tükenme eğilimindedir (Mardis, 2008; Liu ve ark., 2012).

Sunduğu avantajlar şunlardır:

- daha düşük maliyet
- yüksek verimlilik
- daha hızlı geri dönüş
- daha uzun okumalar.



Şekil 2.8. ABI Solid dizileme yöntemi (Voelkerding ve ark., 2009).

2.3.1.6. Dizileme ile genotipleme (GBS)

Yeni nesil dizileme teknolojisindeki gelişmeler dizilenmiş sekans veri çıkışı ile, araştırmacılar için popülasyon genotiplemede büyük yenilikler sağlamıştır. Dizileme yoluyla genotipleme (GBS), genom çapında moleküler markör keşfi ve genotiplemeyi birleştirir. Çok sayıda numunenin az sayıda temsil dizilimi için hızlı ve sağlam bir yaklaşım olarak geliştirilmiştir. Bu uygulamanın esnekliği ve düşük maliyeti, bitki genetiği ve ıslahındaki birçok çalışma için bu uygulamayı mükemmeli bir araç haline getirmektedir. Bitki biyolojisinde bilim insanlarının nihai amacı fenotipi genotiple ilişkilendirebilmektir. Bu sayede bitki ıslahında genotip, fenotipleri tahmin etmek ve gelişmiş kültür bitkilerini seçmek için kullanılabilir. Kalıtsal faktörler ve ortaya çıkan

fenotipler arasındaki bağlantıya dair bilginin artması, ekilebilir alan ve iklim değişikliği nedeniyle küresel gıda kaynaklarını artırmak için gereken genom destekli ıslah çalışmalarına katkıda bulunacaktır. Fenotipi genotiple ilişkilendirmek ve fenotipik tahminler yapabilmek ve bu sayede bitki türlerini seçebilmek için genomik bilgiye ihtiyaç vardır. Bu tür durumlarda genoma dari bilgi veya veri ne kadar fazla ise yapılacak ilişkilendirme çalışmaları o kadar başarılı olacaktır. Bu genomik bilgi için genom üzerinde yoğun moleküler markörleri olan büyük popülasyonlar gereklidir. Bu noktada dizileme ile genotipleme umut vaat eden bir yaklaşımdır. Genomun sadece küçük bir kısmını hedefleyerek restriksiyon endonükleazlar kullanır ve böylece enzim temelli karmaşıklık azaltma yöntemi kullanır (Poland ve Rife, 2012). Dizileme ile genotipleme uygulamasının güçlü bir yaklaşım olduğu ve on binlerce ile yüz binlerce moleküler markör üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Elshire ve ark., 2011; Poland ve ark., 2012a).

Maliyet düşürmek için karmaşıklık azaltma stratejileri kullanan ve yeni nesil dizileme, RNA-Seq, polimorfik sekansların karmaşıklığını azaltma, restriksiyon alanı ile ilişkili DNA dizilemesi ve GBS kullanılarak SNP markörlerinin keşfini basitleştiren birtakım yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu metodolojilerden GBS, düşük maliyetli ve basit bir moleküler biyoloji iş akışı ile eş zamanlı markör keşif ve genotiplemeye izin verebilmesinden dolayı en geniş bitki araştırmacıları tabanına hizmet etme konusundaki en büyük sözü tutar. DNA adaptörleri (biri DNA'ya özgü tanımlayıcı adaptör) fragmanlara bağlanır ve daha küçük DNA fragmanlarının amplifiye edilmesine yönelik olarak bir PCR gerçekleştirilir. Elde edilen PCR ürünleri daha sonra bir yeni nesil dizileme platformu kullanılarak havuzlanır ve dizilir. Amplikonlar parçalanmaz, bu nedenle sadece PCR ürünlerinin uçları sekanslanır. Tanımlayıcı adaptör bir ID etiketi gibi davranır, bu yüzden okumalar bir bireyle ilişkilendirilebilir (Poland ve ark., 2012b; Peterson ve ark., 2014).

Bu teknik, bir referans genomu olan veya olmayan türlere uygulanabilir. Enzim seçimi, belirlenen markör sayısı ve gereken dizi kapsamı miktarını etkiler. Restriksiyon tanıma alanı ne kadar sık olursa, parça sayısı o kadar yüksek olur ve bu nedenle daha fazla potansiyel markör tespit edilebilir. Daha sık kullanılan restriksiyon enzimlerin kullanılması, uygulamaya bağlı olarak daha büyük miktarlarda dizileme gerektirebilir.

GBS, bitki genomiklerinin arenasında gerçek bir devrimci teknoloji olma potansiyeline sahiptir. Günümüze kadar genomik kaynakları neredeyse hiç bulunmayan bitki türlerinin çoğuna yüksek yoğunluklu genotipleme imkanı sunmaktadır. GBS'nin

kullanım alanları, markör keşif, filogenetik, yığın segregant analizi, biparental hatlarda QTL haritalaması, GWAS ve genom seçimindeki uygulamaları içerir. GBS, aday gen keşfinde haritalamaya da uygulanabilir ve de novo genom düzeneğinde yardımcı olmak için yüksek yoğunluklu SNP genetik haritalarının üretilmesinde kullanılabilir. Fonksiyonel genomik ve bitki ıslahında GBS'nin uygulanmasından çok büyük ilerlemeler öngörülmektedir. Çünkü bu model, yeni nesil dizileme için kullanılabilirliği yüksek bir uygulamadır (Poland ve ark., 2012b).

Tek başına bir genomdan sekanslama yapmak yerine dizileme ile genotipleme (GBS), birden fazla genomdan gelen yüksek verimli sekanslamaya ve genom çapında moleküler markör keşfine olanak sağlar (Monteiro ve ark., 2018).

2.3.1.6.1. Bitki ıslahında dizileme ile genotipleme (GBS) uygulaması

Dizileme ile genotipleme (GBS), tek gen işaretleyicilerinden bütün genom profillemesine kadar uzanan araştırmalar için ideal bir platformdur. GBS'nin en güçlü uygulamalarından biri, bitki yetiştirme alanındadır. GBS, ıslah popülasyonlarının genotipine hızlı ve düşük maliyetli bir araç sağlar ve bitki yetiştiricilerinin tüm genom ilişkilendirme çalışmaları (GWAS), genomik çeşitlilik çalışması, genetik bağlantı analizi, moleküler markör keşfi ve bitki ıslah programlarının büyük bir bölümünde genomik seçim yapmasını sağlar. Türlerin genomları hakkında önceden bilgi sahibi olma zorunluluğu yoktur, çünkü GBS yönteminin türler arasında güçlü olduğu ve SNP keşfinin ve genotiplemenin birlikte tamamlandığı gösterilmiştir (Elshire ve ark., 2011).

Tüm genom ilişkilendirme çabaları, yeterli bilgi ve kapsama alanı yaratmak için 100'lerce marköre ihtiyaç duyduğundan, yeni nesil dizileme teknolojilerinin ortaya çıkışı, markör çözünürlüğünü büyük ölçüde iyileştirmiştir. Son zamanlarda, yeni nesil dizileme yaklaşımı ile GBS, spesifik yetiştirme programlarında çeşitli özellikleri analiz etmek, haritalandırmak ve rekombinant saf hatlarının (RILs) koleksiyonlarını yeniden ölçmek için kullanılmıştır. Mısır, buğday, arpa, pirinç, patates gibi daha fazla ürün, verimli, düşük maliyetli ve genom dizileme büyük ölçekleri için GBS tarafından optimize edilmiştir. Soya fasulyesi yetiştirme programları için çok değerli bir genomik kaynak sağlayan, 31 soya genotipini yeniden boyutlandırdıktan sonra 205, 614 SNP markörü tanımlanmıştır. Patatesten, 12.4 gigabyte kaliteli dizi verisi tabanı ve 129, 156 dizi varyantı tanımlanmıştır ve bunlar, patates referans genomuna 2.1 Mb'ye eşlenmiş

olup, kltivar başına medyan ortalama okuma derinliği 636 olmuştur. GBS'nin genomik çeşitlilik çalışmaları için geçerli bir araç olduğu gösterilmiştir (Peterson ve ark., 2014).

Örneğin, Fu ve Peterson (2011) Roche 454 genetik ışlah çalışması uyguladılar. 16 farklı arpa arazi ırkının genetik çeşitliliğini analiz etmek için azaltılmış genom temsili ve gelişmiş biyoinformatik aracı ile FLX Titanyum teknolojisi, 2.578 contig ve 3,980 SNP keşfetti ve ekili arpa gen havuzunda önemli bir coğrafi bölüm olduğunu doğrulamıştır.

Büyük popülasyonların moleküler markörlerini ve genotiplemesini entegre ederek GBS, referans genom sekanslarının yokluğunda veya nceki DNA polimorfizm keşfi olmadan bile bitki yetiştirme uygulamaları için mükemmeli bir platformdur. GBS yaklaşımının, genetik analiz ve lupin, marul, şalgam, soya fasulyesi ve mısırın markör gelişimine uygun olduğu gösterilmiştir. Illumina genom analizörü, dört soya fasulyesi girişi ve referans arasındaki 4294 ila 14550 SNPs'yi tanımladı ve soya fasulyesi genomik DNA'sının *MseI* sindiriminin ve ardından yüksek verimli sekanslamanın SNP markörleri üretmek için hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntem sağladığını gösterdi. Makarnalık buğdayda yüksek verimli SNP keşfi ve genotipleme, iki elit çeşidi arasında bulunan 92 RIL'den araştırılmıştır. GBS'nin patates kltivarlarının geniş bir koleksiyonu üzerine uygulanması, Illumina HiSeq 2000 ile çalışılmış ve olgunluk ve ürün rengi ile güçlü bir Şekilde ilişkili alleller belirlenmiştir (Poland ve ark., 2012).

Geleneksel MAS ile karşılaştırıldığında, genetik ışlah genotipik değerler üzerinde üreme doğruluğunu artırmak için fenotipik ve soy ağacı verileri ile moleküler markörleri birleştiren bir yaklaşımdır. Genetik ışlah ile ilgili teorik ve uygulamalı çalışmalar, yeni ürün çeşitlerini geliştirme oranını hızlandırmak için büyük umut vaat etmektedir. Genetik ışlah için GBS yaklaşımı ile geleneksel mahsulün iyileştirilmesinde önemli bir destekleyici olması ve ticari bitkilere yardımcı üreme genomiklerinin taşınması çok önemli bir özelliktir. GBS uygulamalarının öncülü, yüksek yoğunluklu ve düşük maliyetli tüm genom moleküler markörlerin geliştirilmesidir. Arpa ve buğday çalışmasında GBS yaklaşımı, bir referans genomu olmayan türlerde yüksek yoğunluklu işaretleyicileri geliştirme için güçlü bir yöntem sunarken, aynı zamanda fiziksel haritalar ve tüm genom shotgun dizisi için değerli araçlar sağlar.

Dizileme ile genotipleme, ürün geliştirmede SNP'lerin keşfedilmesi ve genotiplendirilmesi için NGS protokollerinin yeni bir uygulamasıdır. GBS'nin düşük maliyeti, yüksek yoğunluklu SNP işaretleyicileri ile haritalama ve üreme popülasyonlarını doyurmak için çekici bir yaklaşımdır. Sıralama teknolojilerinin ve

temel çağrı yazılımlarının başarılı bir şekilde iyileştirilmesi, NGS teknolojilerinin, çalışma başına daha yüksek sıralama verimi vermesine olanak tanır. Sabit bir ortalama sıralama derinliği için daha derin çoğullama sağlar (Liu ve ark., 2012; Mardis ve ark., 2008).

Her bir çalışma için üretilen dizi bilgisinin miktarı ve kalitesi arttıkça, bu da örnek başına daha yüksek pleksing ve daha düşük maliyetler sağladığından, GBS diğer bütün genom genotipleme platformlarına maliyet açısından rekabetçi bir alternatif haline gelmiştir. NGS'den yüksek yoğunluklu SNP işaretleyicilerinin GWAS, MAS ve genetik ıslaha yoğun olarak uygulanacağı tahmin edilebilir. Bitki yetiştiricileri büyük bitki genomlarını bile sıralayabilir ve yüksek yoğunlukta markör haritası oluşturabilir (Poland ve ark., 2012a).

Islah popülasyonlarından bağlantı haritaları GBS'nin mahsulün iyileştirilmesine yönelik gelecekteki uygulamaları, bitki yetiştiricilerinin, daha önce herhangi bir moleküler aleti geliştirmek zorunda kalmadan, yeni bir germplazma veya tür üzerinde MAS veya genetik ıslahı gerçekleştirmelerine izin verebilir. Dizi tabanlı genotipleme tüm genomik çalışmalar için mevcut olduğundan, GBS bitki genetiği ve ıslahında ana bileşenlerden biri olmaya devam edecektir (Poland ve ark., 2012b).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Şeker Pancarı Genomunun Mikrosatelit Markörleri Geliştirmek Üzere Analiz Edilmesi

Şeker pancarı 566.550.431 bp uzunluğundaki genomu [PRJNA41497](#) nolu başlık altında NCBI veri tabanından indirilmiştir. Tez çalışması sonucunda geliştirilmiş olan markörler Blast2GO yazılımı kullanılarak olası protein fonksiyonları tahmin edilmiştir.

3.1.1. DNA izolasyonu

Şeker pancarı genotiplerine ait yaprak dokularının DNA örnekleri, bu amaçla seçilmiş olan DNA parçalarının çoğaltılması, geliştirilmiş olan mikrosatelit markörlerinin genotiplenmesi aşamasında kullanılmıştır. Doku örnekleri, Qiagen TissueLyzerII cihazında ve 200 ng doku örneği üzerine 800 µL CTAB ekstraksiyon tampon çözeltisi (%2 CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA (pH 8.0), 1.4 M NaCl, %1 PVP-40) eklenmiştir. Karışıma 100µL merkaptolanol eklenerek, vortex cihazı yardımı ile karışımın homojenizasyonu sağlanmıştır. Örnek, hücre duvarlarının yıkılmasını amacı ile 65°C' de 1 saat süreyle inkübe edilerek, inkübasyonun ardından hacimce (25:24:1) oranında karışılmış olan fenol:kloroform:izoamil alkol örneğe eklenerek, önce vortex cihazı ile karıştırılıp, ardından oda sıcaklığında 10 dakika santrifüjlenmiştir. Üst faz, temiz bir 2 ml'lik deney tüpüne aktararak, 600 µL, hacimce 24:1 oranında hazırlanmış kloroform:izoamil alkol örneğe eklenmiştir. Oda sıcaklığında 10 dakika süreyle gerçekleştirilen santrifüj işleminin ardından, üst faz 1.5 ml'lik temiz bir tüpe aktararak, kendi hacminin altıda biri oranında %100'lük izopropanol ile karıştırılmıştır. DNA peletinin elde edilmesi için deney tüpü oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. Peletin (DNA çökeltisi) izopropanolden temizlenmesi amacı ile inkübasyonun ardından örnek 10 dakika oda sıcaklığında santrifüjlenerek, üst faz atılmıştır. Deney tüpünün çeperinde elde edilmiş olan DNA peletinin üzerine %70'lik etanol eklenerek yıkama yapılarak, yıkamanın ardından oda sıcaklığında 5 dakika süreyle santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir. Etanol fazı santrifüjün ardından atılarak, DNA peletinin etanolden tamamen arındırılması amacı ile deney tüpü 50°C'de 2 dakika kapağı açık şekilde bekletilmiştir. 100 µL, otoklavda sterilize edilmiş distile su, DNA'nın süspanse edilmesi amacı ile eklenmiştir. Opsiyonel olarak 4°C'de bir müddet

bekletilmesi, DNA'nın daha homojen şekilde süspansiyon olmasını sağlamaktadır. DNA ekstraksiyonu sırasında, DNA ile birlikte izole edilmiş olması muhtemel olan RNA'nın degradasyonu, ekstrakte edilmiş olan DNA örneklerine 1 µL RNase enzimi katılıp, tüplerin 37°C'de 30 dakika inkübe edilmesi ile sağlanmıştır. Ekstrakte edilmiş olan DNA örneklerinin konsantrasyonu ve saflığı, Nanodrop spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür.

3.1.2. Mikrosatelit markör analizleri

Şeker pancarı yaprak DNA örneklerinden tez çalışması kapsamında geliştirilmiş olan mikrosatelit markörünün çoğaltılması için gerçekleştirilmiş olan PCR reaksiyon karışımları için 1x AmplitaqGold® PCR Tamponu, 2.5 mM MgCl₂, 200µM her bir dNTP (Promega), 300 nM her bir primer, 0.5 ünite AmplitaqGold® polimeraz enzimi (Applied Biosystems Foster City CA), 1.0µL şeker pancarı yaprak DNA'sı ve nükleaz içermeyen H₂O içeren bir protokol hazırlanmıştır. Toplam reaksiyon hacimleri 20µL'dir. PCR ürünleri belirtilen programla çoğaltılmıştır: başlangıç DNA denatürasyonu için 95°C'de 10 dakika; denatürasyon için 95°C'de 30 saniye; tavlama (annealing) reaksiyonu için 60°C'de (primerlere göre bu sıcaklık dereceleri değişiklik gösterebilmektedir) 30 saniye ve uzama için 72°C'de 30saniye (35 döngü olmak üzere); son uzama 72°C'de 10 dakika ve 4°C'de tutmayı içermektedir. Bu şeker pancarı genotiplerine ait DNA örneklerinden çoğaltılmış olan SSR markörleri, Qiaxcel Fragment Analyzer (Qiagen Sample&Assay Technologies) kapiler elektroforez sistemi ile görüntülenmiştir.

3.1.2.1. Seçilen markörlerin PCR ile test edilmesi

Şeker pancarında tespit edilmiş ve primer bilgisine sahip olan 48,736 markörün içerisinde 10 tanesi rastgele seçilerek bu markörler PCR işlemi ile test edilmiştir. GMATA (Wang ve Wang, 2016) programının bütün markörlere primer tasarlama özelliğinden faydalanılarak, primer bilgileri GMATA üzerinden markörlere özgü olarak elde edilmiştir (Tablo 3.1.). PCR uygulaması için 11 çeşit şeker pancarı kullanılmıştır. Şeker pancarının yapraklarından DNA izole edilerek genomik DNA elde edilmiştir ve ardından primerler ile PCR yapılarak polimorfizm bilgileri için test edilmiştir.

Tablo 3.1. Şeker pancarı kromozomlarından rastgele seçilmiş 10 adet markör için GMATA programında geliştirilmiş olan primer sekansları

<i>Beta vulgaris</i> markör	Primer Sol	Primer Sağ	Erime Sıcaklığı 1
MKBVCHR1- 234	TCGCCTGTTGGTCATCACT	CAACACACCAGCCTGAAACA	60
MKBVCHR2- 2091	CGTTACTTACGTTACTTCTTCGT CT	CATGGAGCATGTTGTGAATG	58
MKBVCHR3- 1498	AGTACGACCGAAACCTAAACTA AC	CGGGCATTACCCCAAGTAG	60
MKBVCHR4- 1036	CCCGAGCAACAACAATAACA	GGCATCACACTCAAATTCTC C	59
MKBVCHR5- 1011	CAACAACAGCAGTAGCAGCA	TCAGTTCAGTTCAGTTCAGCT C	57
MKBVCHR6- 4290	AAATTAGGGGCGTTTGGTTC	TATTAAGCGGGATTCGTCAA	58
MKBVCHR7- 770	TCGTTGATTCTCCGTTTTGG	CAACACAACACAACGCTTGC	61
MKBVCHR7- 3251	CAAACACACACACACATGC	CCCGACTTACTGGTGCTTTC	59
MKBVCHR8- 1822	TGAAACCACCATAACCACCA	TTGGTGCACGAGGTTGTAAA	60
MKBVCHR9- 3048	CTTGCCAATTCCAACCTTCA	CATGACTATGGACGATGTAC GA	58

3.1.3. Veri analizleri

Her bir mikrosatellit markörü için, parçacıklar Matsuoka ve ark. (2002) tarafından tanıtilan yöntem kullanarak farklı alel'leri temsil eden bin'lere bölünür. Her bir markör için polimorfizm bilgi içeriği (PIC- Polymorphism information content) değeri her bir SSR markörü için Saal ve Wricke (1999) tarafından tanıtilan formüle göre hesaplanmaktadır:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2$$

p_i i 'inci alel'in sıklığını (*frequency*) ve k ise her lokus için farklı alel'lerin toplam sayısını vermektedir.

Bütün genotiplerin özün bir lokus için mikrosatellit değerleri: var (present) için 1, yok (absent) için 0 ve heterozigot bireyler içinde 0.5 gibi değerlerle skorlanmıştır. Bu veriler Nei'nin genetik benzerlik indeksinin (The Nei index of genetic similarity) hesaplanmasında kullanılmıştır (Nei ve Li, 1979). Elde edilen bu değerler Darwin (Perrier ve Jacquemoud-Collet, 2006) yazılımı kullanılarak Neighbour-joining yöntemi

uygulanarak şeker pancarı genotipleri arasındaki genetik ilişkiyi gösteren bir dendogramda çizilerek çeşitlilik analizi yapılmıştır.

3.1.4. Markör geliştirme

Şeker pancarının (*Beta vulgaris*) 9 kromozomunun sekans bilgileri NCBI veribankasından FASTA formatında indirilmiştir ([CM002321.2](#), [CM002322.2](#), [CM002323.2](#), [CM002324.2](#), [CM002325.2](#), [CM002326.2](#), [CM002327.2](#), [CM002328.2](#), [CM002329.2](#)) (Dohm ve ark., 2014). Markör geliştirme işlemi, GMATA (Wang ve Wang, 2016) programı ile biyoinformatik olarak gerçekleştirilmiştir. Program kullanılarak markör dizaynı, primer dizaynı ve e-map işlemleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.1.).

GMATA programı ile birlikte Perl, R ve Java programlarının da kurulumu yapılmıştır.

3.1.4.1. SSR markörlerinin geliştirilmesi

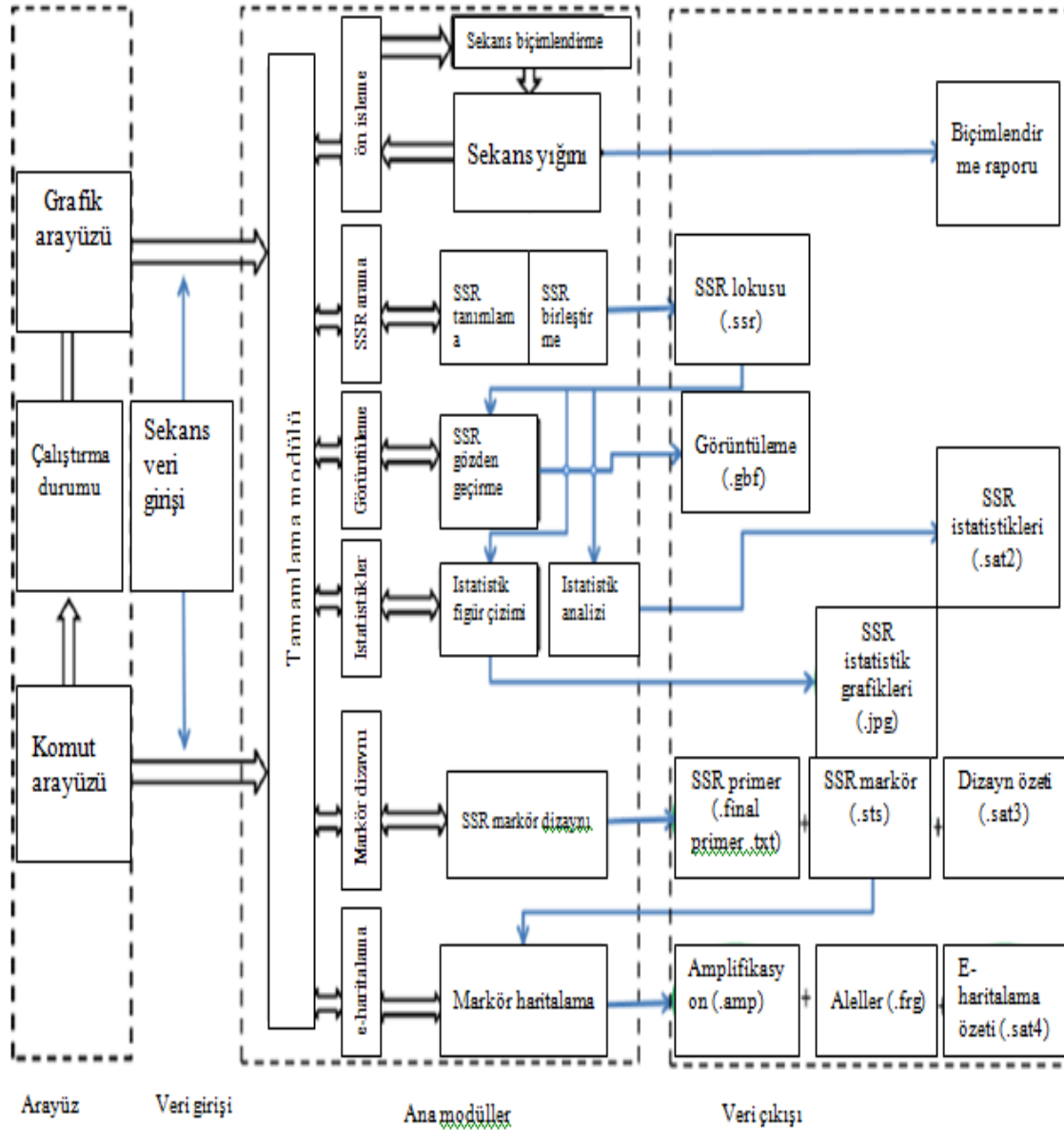
Şeker pancarının indirilmiş olan her 9 kromozomu (Dohm ve ark., 2014) için, GMATA programınının, ‘SSR belirleme bölümü kullanılarak’, SSR tekrar motifleri geliştirilmiştir. Fasta formatında indirilmiş olan kromozom sekansları ile SSR tanımlama işlemi başlatılmış ve motifler tanımlanmıştır. Bu motifler, 5 tekrarlı olmak üzere, en kısa 2, en uzun 6 nükleotitten oluşacak şekilde belirlenmiştir. Yapılan işlemin ardından (.ssr) ve (.sat) dosyaları çıktı olarak alınmıştır.

3.1.4.2. Markör dizaynı

Programda oluşturulmuş ve çıktısı alınmış olan ssr lokus dosyası (.ssr) ile ‘Markör dizaynı’ bölümünde markör ve primer dizaynı gerçekleştirilmiştir. Programda geliştirilecek olan SSR markörleri için, minimum büyüklük 100 baz çifti, maksimum büyüklük 300 bazçifti olarak tanımlanmıştır. Bu işlemin ardından (.mk), (.seq) ve (.sts) dosyaları çıktı olarak alınmıştır. Bu dosyalar, primer sekans bilgisi, primerin oluşturduğu ürünün uzunluğu ve primerlerin erime sıcaklık bilgisi, kromozomdaki konumları ve oluşturulan markörlerin sekans bilgilerini içerir.

3.1.4.3. Fiziksel haritalama

Programın 'e-Map' bölümünde, oluşturulmuş olan (.sts) dosyası ile e-PCR işlemi gerçekleştirilmiştir ve geliştirilen markörler fiziksel olarak haritalanmıştır. Maksimum indel ve maksimum mismatch parametreleri '0' olarak belirlenmiştir. (.emap), (.amp), ve (.frg) dosyaları çıktı olarak alınmıştır.



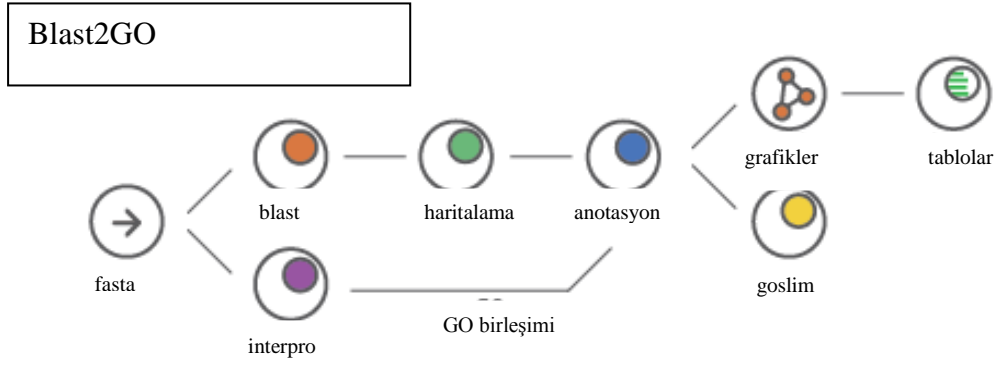
Şekil 3.1. GMATA iş akış şeması(Wang ve Wang, 2016).

3.1.4.4. Geliştirilen markörlerin fonksiyonunun belirlenmesi

Geliştirilmiş olan markör sekansları ile şeker pancarının özdeş protein sekansları, Blast2GO programı kullanılarak analiz edilmiştir. Markör sekansları ile protein sekansları blast edilerek, anotasyon işlemi markör sekanslarının olası protein fonksiyonları tespit edilmiştir.

Blast2GO programında, GMATA programında geliştirilmiş olan markör dosyaları kullanılmıştır. Öncelikle GMATA programında oluşturulmuş olan dosyalar fasta formatına dönüştürülmüştür. Bu işlem, GMATA'dan elde edilen (.mk) ve (.seq) dosyalarının ilgili kısımlarının Excel dosyasında birleştirilerek, fasta formatına uygun modifiye edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Ardından bu Excel dosyası fasta formatına dönüştürülmüştür. Protein sekansları için NCBI veritabanından şeker pancarının (sugar beet) tanımlanmış protein sekansları (yaklaşık 43,300 protein sekansı) fasta formatında indirilmiştir.

Programda 'Dosya (File)' sekmesinde 'Load Fasta File' seçeneği kullanılarak, markör bilgilerinin ve sekansların bulunduğu fasta dosyası programa yüklenmiştir. Ardından 'Blast' sekmesinde 'Make Blast Database' seçeneği ile protein sekanslarının dosyası yüklenmiş ve (.phd) ve benzeri 8 dosya çıktı olarak alınarak 'Local Database' oluşturulmuştur. Tekrar 'Blast' sekmesinde 'Run Blast' seçeneğine girilerek 'Local Blast' seçeneği kullanılmıştır. Açılan bölümde (.phd) çıktısı alınmış olan dosya seçilerek 'Run Blast' işlemi gerçekleştirilmiştir. Blast işlemi tamamlandıktan sonra 'Mapping' sekmesiyle haritalama yapılmış ve ardından 'Annotation' işlemi gerçekleştirilmiştir. Gerekli işlemler tamamlandıktan sonra 'Export' işlemi ile yapılan uygulamanın çıktısı alınmıştır ve 'Graphs' bölümünden oluşturulan grafikler çıktı olarak alınıp sonuçlar kısmında gösterilmiştir. Programın kullanılan akış şeması şekil 3.2.'de gösterilmiştir. Geliştirilen mikrosatelit markörlerine ait veri ve fonksiyonel anotasyon verilerine <http://doi.org/10.6084/m9.figshare.9265121> adresinden erişilebilir.



Şekil 3.2. Blast2GO akış şeması



4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Sonu çar

Yeni nesil dizileme teknolojilerindeki gelişmeler ve biyoinformatik araçların gelişimi, canlıların genomunun markör bakımından doyurulmasını hızlandırmış ve kolaylaştırmıştır (Uncu, 2018). Bu çalışmanın amacı, şeker pancarında mikrosatelit markörlerin keşfi ile şeker pancarında şimdiye kadar tespit edilmiş olan SSR markör sayısını artırmaktır. Sonuç olarak, şeker pancarının var olan tüm kromozomları, mikrosatelit markörleri bakımından karakterize edilmiştir.

4.1.2. Mikrosatelit markör tespiti

Beta vulgaris genomu, 9 kromozomun üzerine dağıtılmış 376.5 megabazlık (Mb) diziden oluşmaktadır (Dohm ve ark., 2014). *Beta vulgaris*'in var olan 9 kromozomunda 2 ve 6 nükleotitten oluşan en az 5 tekrarlı SSR motifleri tespit edilmiştir. Bu çalışmada toplamda 75,172 SSR lokusu tespit edilmiştir (<http://doi.org/10.6084/m9.figshare.9265121>). Bu SSR'lerden 48,736 tanesi primer sekans bilgisine sahiptir ve PCR uygulaması için uygundur. 12,377 SSR ile en yüksek sayıda markör kromozom 6'da bulunmaktadır ve 10,625 SSR ile onu kromozom 5 takip etmektedir. En düşük sayı, 5,279 SSR ile kromozom 3'te tespit edilmiştir (Tablo 4.1.). Aynı zamanda kromozom büyüklüğü (kb), markör sayısına bölünerek her bir kromozom için kilobaz başına düşen markör sayısı yani yoğunluk hesaplanmıştır ve sonuçlar Tablo 4.1.'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. SSR Tespiti İstatistikleri

Kromozom	Markör Yoğunluğu	Tanımlanmış SSR lokusu	Primer sekans bilgisine sahip olanlar
1	7.8	6831	4432
2	7.7	7982	5212
3	7.5	5279	3539
4	7.7	6488	4265
5	7.6	10625	6843
6	7.6	12377	7987
7	7.9	8484	5530
8	7.5	8004	5130
9	7.8	9102	5798
Toplam	-	75,172	48,736

En az 2, en fazla 6 nükleotid olmak üzere belirlenmiş SSR motiflerinin tekrar eden nükleotid sayısına göre dağılımı Tablo 4.2.'de gösterilmiştir. Tekrar eden nükleotid sayısı azaldıkça tespit edilen markör sayısı genel olarak artmaktadır (Lagercrantz ve ark., 1993; Morgante ve Olivieri, 1993; Wang ve ark., 1994) (Grafik 4.1.).

Tablo 4.2. SSR motiflerinin tekrar nükleotit sayılarının genel gösterimi

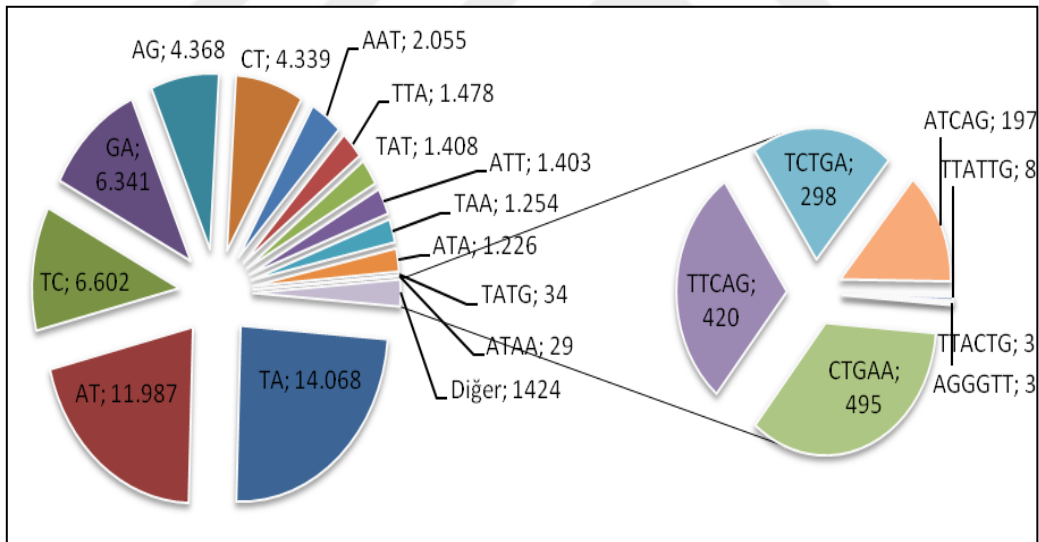
Motif (-mer)	Toplam
2	53,631
3	16,662
4	866
5	3186
6	827

Tüm genom boyunca, 14,068 tekrar ile 'TA' nükleotit motifi en çok tekrar eden motif olarak bulunmuştur ve onu 11,987 tekrar ile 'AT' nükleotit motifi takip etmektedir. En çok tekrar eden trinükleotid motifi 'AAT', en çok tekrar eden tetranükleotid motifi 'TATG', en çok tekrar eden pentanükleotid motifi 'CTGAA' ve en çok tekrar eden hexanükleotid motifi 'TTATTG' olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.3. – Grafik 4.1.).

Tablo 4.3. SSR motifleri ve sayısı

SSR motifi	SSR'ların sayısı	Motif türü	SSR motifi	SSR'ların sayısı	Motif türü
TA	14.068	di*	CTGAA	495	penta****
AT	11.987		TTCAG	420	
TC	6.602		TCTGA	298	
GA	6.341		ATCAG	197	
AG	4.368		TTATTG	8	hexa*****
CT	4.339		AGGGTT	3	
AAT	2.055	tri**	T TACTG	3	
TTA	1.478				
TAT	1.408				
ATT	1.403				
TAA	1.254				
ATA	1.226				
TATG	34	tetra***			
ATAA	29				

*en çok sayıya sahip ilk 6 örnek, ** en çok sayıya sahip ilk 6 örnek, ***en çok sayıya sahip ilk 2 örnek, ****en çok sayıya sahip ilk 4 örnek, *****en çok sayıya sahip ilk 3 örnek belirtilmiştir.



Grafik 4.1. Tablo 4.3'te gösterilen SSR motiflerinin ve markörlerinin tespit edilen sayılarının grafik üzerinde dağılımı.

Rae ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, *Beta vulgaris*'in markör destekli ıslahında kullanımı için basit dizi tekrarları tanımlamıştır. 1536 klondan oluşan genomik kütüphaneler oluşturularak yapılan bu çalışmada klonlar 'CA, CT, CAA, CATA ve GATA' nükleotid tekrarlı problemlerle taranmıştır ve klonların %50'sinden fazlasında pozitif hibridizasyon gözlenmiştir. Bunlardan 340 tanesi sekanslanmıştır. 'CT, CAA, CATA ve GATA' tekrarlarının varlığı için taranan toplam 1356 klonda, RsaI

kütüphanesinde 763 tane (%49.2) pozitif klon ve SspI kütüphanesinde 918 tane (%59.7) pozitif klon tespit edilmiştir. Oluşturulan genomik kütüphanede SSR motif frekansları 'CA' tekrarı için %57.6 ve 'CT' tekrarı için %2.2 olarak tespit edilmiştir (Rae ve ark., 2000). Rae ve arkadaşlarının bulduğu sonuçlar, Mörchen ve arkadaşlarının 1996'da yaptıkları çalışma sonucu, şeker pancarında en yaygın tekrar motifinin 'CA' motifi olduğunu ortaya koydukları sonuçlarla uyusmaktadır.

Rae ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada klonların spesifik problemlerle taranması tespit edilen markör çeşitliliğini azaltmaktadır, yani tespit edilen markörler seçilen problemlerle sınırlı kalmaktadır. Halbuki bu tez kapsamında yapılan çalışmada genom, var olan tüm 2 – 6 nükleotid tekrar motifleri için taranmıştır. Bu durum tespit edilen SSR'ların sayısında ve motiflerinde çeşitliliğin artmasını sağlamaktadır.

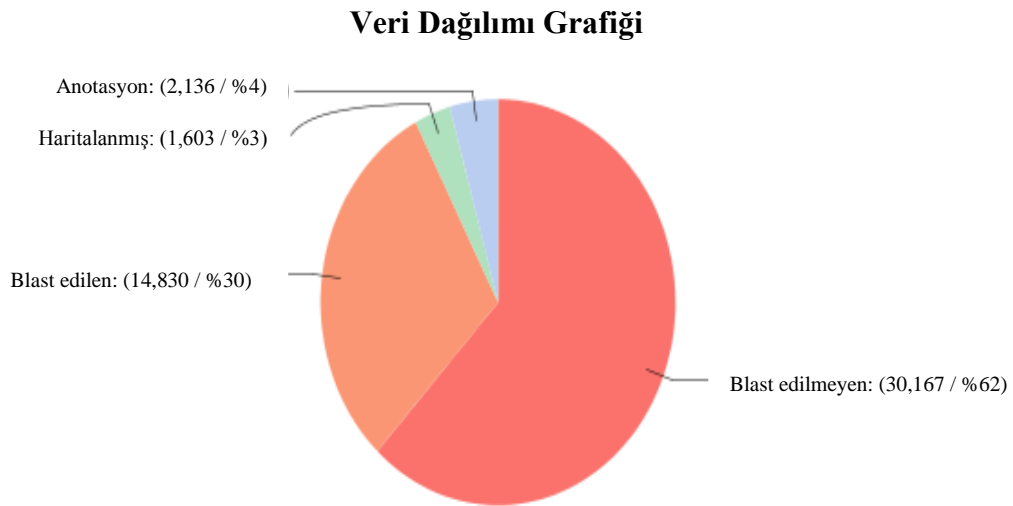
Şeker pancarında transkripsiyona bağlı olarak SSR markör karakterizasyonu yapılmış başka bir çalışmada, en çok tekrar eden dinükleotid motifi 'AG' ve en çok tekrar eden trinükleotid motifi 'CTT' olarak tespit edilmiştir (Fugate ve ark., 2014). Fugate ve arkadaşları, şeker pancarında SSR üretmek için, şeker pancarının kök ve yaprak dokularının ifadelenen genleri ile transkriptom analizi yapmıştır. Analiz edilen transkriptom toplamda 82,404 gen içermektedir. Çalışma sonucunda 7680 SSR tanımlanmıştır ve 288 SSR lokusu için primer dizayn edilmiştir. En sık görülen SSR motifleri dinükleotidler ve trinükleotidler olarak tespit edilmiştir. Dinükleotidler toplam motiflerin %22'sini, trinükleotidler %67'sini ve tetranükleotidler %5'ini oluşturmaktadır. Bunlardan en sık görülen motifler 'AG, CTT ve AAAT' olarak bulunmuştur.

Şeker pancarında yapılan bu çalışma ile Fugate ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma sonucu tespit edilen SSR lokuslarındaki farklılığın bir sebebinin, Fugate ve arkadaşlarının çalışmalarının SSR tespiti için şeker pancarının sadece belirli dokularındaki ifadelenen genlere odaklanması ve bunu araştırması olabileceği düşünülmektedir. İfadelenen genler üzerinde yapılan bir çalışma tüm genom bilgisini kapsamamakta ve ifadelenen genleri göz ardı etmektedir. Bu nedenle tüm genomu kapsayan çalışmalar daha fazla sayıda SSR lokusunun tespit edilmesine olanak sağlamaktadır ve genom hakkında daha fazla bilgi içermektedir. Bu tez kapsamında yapılan çalışmada gen-protein ilişkisinin tespiti için, markörlerin protein fonksiyonlarının belirlenebilmesi amacıyla Blast2GO programı kullanılmıştır ve genom kapsamında markörlerin olası protein fonksiyonları tespit edilmiştir (Tablo 4.4.).

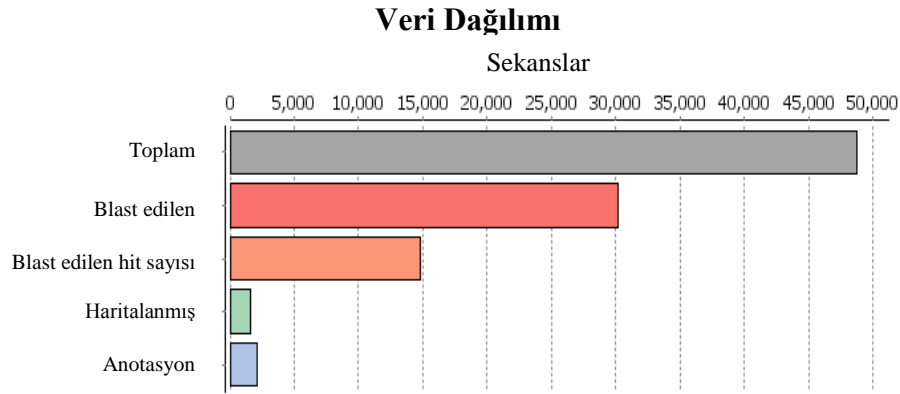
Şeker pancarında mikrosatelit markör tespit edilmesi ile ilgili yapılan diğer çalışmalar ise genel olarak kütüphane oluşturma ve sekanslama yöntemlerine dayanmaktadır. Bu yaklaşım da şeker pancarı genomuna erişimi, biyoinformatik yaklaşımlara göre kısıtlamaktadır. Bu çalışmada biyoinformatik araçlar kullanılarak, şeker pancarının tüm genomu ve var olan tüm koromozomları mikrosatelit markörleri bakımından karakterize edilmiştir.

4.1.3. Markörlerin protein fonksiyonlarının analiz edilmesi

Geliştirilen markörlerin protein fonksiyonları Blast2GO programı kullanılarak analiz edilmiştir. Primer sekans bilgisine sahip 48,736 SSR lokusu, NCBI veritabanından indirilmiş olan şeker pancarının tanımlı protein sekansları ile hizalanmıştır (<http://doi.org/10.6084/m9.figshare.9265121>). Ardından yapılan anotasyon sonucu geliştirilen markör setinin 14,83 hit ile %30 oranında, şeker pancarında ifade edilen sekanslar ile birebir benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Grafik 4.2. – 4.3.). Şeker pancarının sekanslanmış protein sayısının artmasıyla birlikte bu sayıların da artış göstereceği düşünülmektedir.



Grafik 4.2. Şeker pancarı protein sekansları ile yapılan blast sonucu tespit edilen fonksiyon değerleri



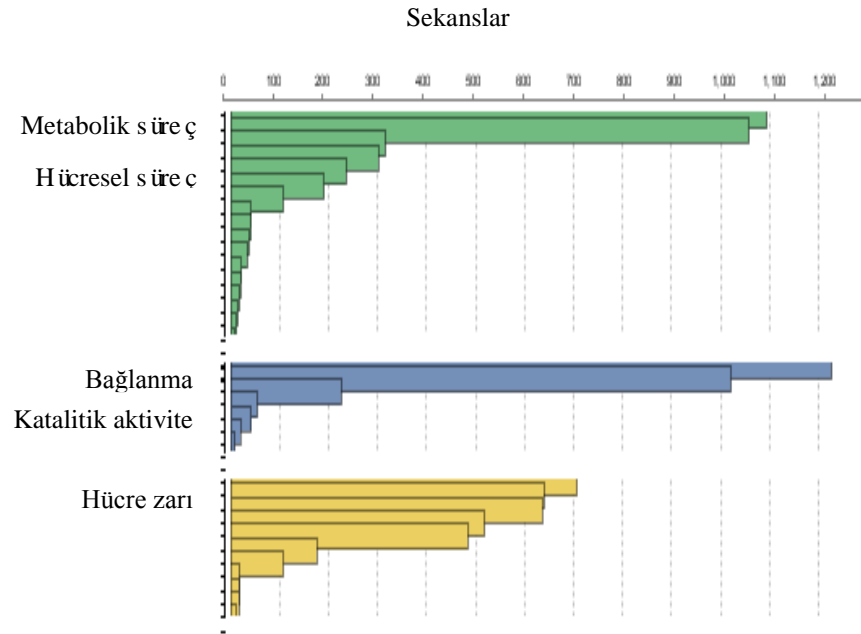
Grafik 4.3. Şeker pancarı protein sekansları ile yapılan blast sonucu tespit edilen sekans sayı değerleri

Markör sekansları ile protein sekanslarının eşleştirilmesi işleminin sonucunda markörlerin önemli işlemlerde görev yapan protein sekansları ile örtüştüğü tespit edilmiştir. Canlının yaşamında önemli rol oynayan, metabolik süreç (1094 markör), hücresel süreç (1058 markör), bağlanma (1226) markör, katalitik aktivite (1021 markör) ve hücre zarı (707 markör) gibi fonksiyonlarda etkili olabilecek çok sayıda markör tespit edilmiştir (Tablo 4.4. – Grafik 4.4.).

Tablo 4.4. Markör sekansları eşleşen protein sekanslarının olası fonksiyonları.

Protein işlevi	Markör sayısı*
metabolik süreç	1094
hücresel süreç	1058
lokalisasyon	316
uyaranlara cevap verme	302
biyolojik düzenleme	236
biyolojik proseslerin düzenlenmesi	191
hücresel bileşen organizasyonu veya biyogenez	108
bağlanma	1226
katalitik aktivite	1021
taşıyıcı aktivitesi	226
hücre zarı	707
hücre	639
hücre kısımları	636
organel	518
hücre zarı kısımları	484
organel kısımları	176
protein içeren kompleks	108

*Sadece markör sayısı 100'ün üzerinde olan eşleşmeler gösterilmiştir



Grafik 4.4. Markör sekansları ile eşleşen protein sekanslarının olası fonksiyonlarının grafik ile gösterimi.

Markör sekansları ile protein sekanslarının blast edilmesi işlemi sonucunda birbiriyle örtüşmeyen sekanslar elde edildiği gibi, birbiriyle yüksek oranlarda örtüşen çok sayıda sekans da elde edilmiştir (Grafik 4.2.). Çok sayıda markör, protein sekansları ile yüksek oranlarda örtüşerek olası markör-protein ilişkileri için test edilebilir hale gelmiştir. Bunların içinden blast olma (örtüşme) oranları %100 olan, rastgele seçilmiş 50 adet markör ve bu markörlerin olası protein fonksiyonları Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.' da gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Blast oranları %100 olan rastgele seçilmiş 50 adet markör ve olası protein fonksiyonları

Markör	Protein Sekansı
MKBVCHR1-14	etilen duyarlı transkripsiyon faktörü ERF014
MKBVCHR1-36	ubiquitin katlama modifiye edici
MKBVCHR1-1476	serin / treonin-protein kinaz SAPK2
MKBVCHR1-1724	endoplazmik retikulum-Golgi ara kısım proteini
MKBVCHR1-4139	RNA bağlayıcı protein
MKBVCHR2-39	omega-3 yağ asidi desaturaz, kloroplastik
MKBVCHR2-338	UDP-glikozil transferaz 76C4
MKBVCHR2-462	DNA replikasyon başlatma faktörü MCM6
MKBVCHR2-486	mannoz-6-fosfat izomeraz
MKBVCHR2-687	transkripsiyon faktörü MYB82
MKBVCHR2-700	oksin taşıma proteini BIG
MKBVCHR2-792	metil transferaz benzeri protein
MKBVCHR2-796	serin karboksipeptidaz benzeri protein
MKBVCHR2-929	peroksidaz P7
MKBVCHR2-1113	oksin duyarlı protein IAA27
MKBVCHR2-1191	şaperon proteini ClpB4, mitokondriyal
MKBVCHR2-1044	ubiquitin karboksil ucu hidrolaz
MKBVCHR2-1045	ubiquitin karboksil ucu hidrolaz
MKBVCHR3-3004	DNA'dan RNA yapan polimeraz ın V alt birimi 5A
MKBVCHR3-3051	ferrodoksin bağımlı glutamat sentaz, kloroplastik
MKBVCHR3-3054	glutamat sentaz
MKBVCHR3-3457	DNA tamir proteini RAD50
MKBVCHR3-3458	DNA tamir proteini RAD50
MKBVCHR3-3506	Plasmodezmata Kalloz bağlayıcı protein

Tablo 4.6. Blast oranları %100 olan rastgele seçilmiş 50 adet markör ve olası protein fonksiyonları

Markör	Protein Sekansı
MKBVCHR4-530	riboflavin biyosentezi proteini PYRR, kloroplastik
MKBVCHR4-637	olası pektinesteraz/pektinesteraz inhibitörü
MKBVCHR4-656	fosfolipaz D zeta
MKBVCHR4-695	kalmomodulin bağlayıcı protein 60A izoformu X2
MKBVCHR4-791	14,5-DOPA dioksijenaz estradiol
MKBVCHR4-4124	serin asetil transferaz, kloroplastik
MKBVCHR4-4134	sistein sentaz
MKBVCHR5-71	oksine duyarlı protein SAUR36
MKBVCHR5-131	birincil amin oksidaz benzeri
MKBVCHR5-1133	serin / treonin protein kinazı BLUS1
MKBVCHR5-1134	serin / treonin protein kinazı BLUS1
MKBVCHR5-1383	hidroksi izo flavanon dehidrataz benzeri
MKBVCHR5-1499	klorofil a-b bağlayıcı protein CP29.3, kloroplastik
MKBVCHR5-1500	klorofil a-b bağlayıcı protein CP29.3, kloroplastik
MKBVCHR5-3873	çınko parmak proteini VAR3, kloroplastik
MKBVCHR5-4052	ABA ilişkili protein C2 Domaini
MKBVCHR5-4507	siklin bağımlı kinaz D-1
MKBVCHR5-4508	siklin bağımlı kinaz D-1
MKBVCHR6-1201	aspartil proteaz ailesi proteini izoform X2
MKBVCHR6-1202	aspartil proteaz ailesi proteini izoform X2
MKBVCHR6-1203	aspartil proteaz ailesi proteini
MKBVCHR6-1298	L-askorbat oksidaz homologu
MKBVCHR7-2420	E3 ubiquitin-protein ligaz MIEL1
MKBVCHR9-1064	gliserol-3-fosfat asiltransferaz
MKBVCHR9-1140	çınko parmak proteini ZAT5

4.1.3.1. Glutasyon sentezi ile ilişkilendirilmiş olan markörler

Bu tez kapsamında geliştirilmiş olan markörlerden glutasyon ile ilişkili olabilecek markörler tespit edilerek, markör-protein ilişkilendirmesi için örnek olarak sunulmak istenmiştir.

Glutasyon oksidatif strese karşı güçlü bir antioksidandır ve hücre çoğalmasını, apoptozu, bağıışıklığı ve çeşitli hücresel süreçleri düzenler (Lu, 2013). Glutasyon sentezi ile ilişkili olabilecek 60 adet markör tespit edilmiştir ve bu markörlerden 10 tanesi Tablo 4.7.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Glutasyon sentezi ile ilgili olabilecek markörler ve eşleştikleri protein sekansları

Markör	Protein Sekansı	Blast (Örtüşme) Oranı
MKBVCHR1-10	glutasyon redüktaz, kloroplastik	84.93%
MKBVCHR1-1187	glutasyon S-transferaz T2-benzeri	95.83%
MKBVCHR2-1727	glutasyon S-transferaz T3-benzeri	94.12%
MKBVCHR4-2074	glutasyon sentetaz, kloroplastik	82.76%
MKBVCHR5-449	glutasyon S-transferaz T1	80.77%
MKBVCHR5-452	glutasyon S-transferaz T1 izoform X2	49.38%
MKBVCHR6-5788	glutasyon S-transferaz 2-benzeri	83.33%
MKBVCHR6-7914	glutasyon S-transferaz U17	100%
MKBVCHR7-2935	glutasyon gama-glutamil sisteinil transferaz 3-benzeri izoform X1	95.45%
MKBVCHR9-929	laktoilglutasyon liyaz izoform X2	88.00%

¹ glutasyon redüktaz, kloroplastik protein sekansı için 4 adet markör tespit edilmiş, 1 tanesi seçilmiştir.

² glutasyon S-transferaz T2-benzeri protein sekansı için 31 adet markör tespit edilmiş, 1 tanesi seçilmiştir.

³ glutasyon S-transferaz T3-benzeri protein sekansı 14 adet markör tespit edilmiş, 1 tanesi seçilmiştir.

⁴ glutasyon sentetaz, kloroplastik protein sekansı için 2 adet markör tespit edilmiş, 1 tanesi seçilmiştir.

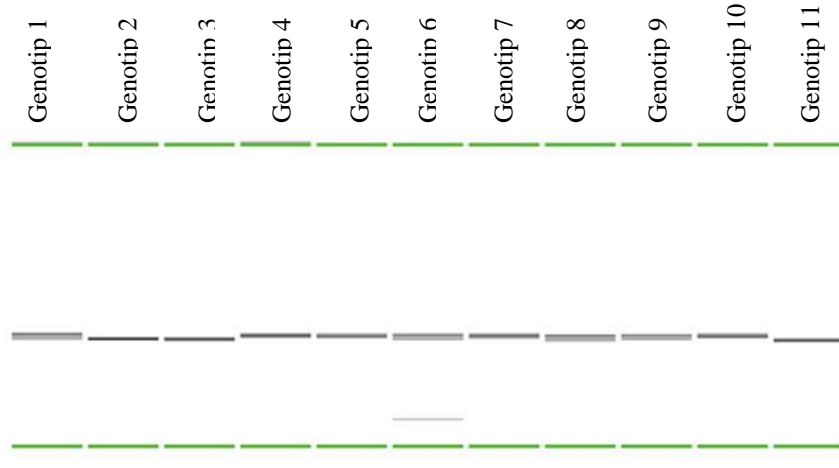
⁵ glutasyon S-transferaz T1 protein sekansı için 3 adet markör tespit edilmiş, 1 tanesi seçilmiştir.

⁶ glutasyon S-transferaz 2-benzeri protein sekansı için 2 adet markör tespit edilmiş, 1 tanesi seçilmiştir.

4.2. Geliştirilen SSR Markörlerinin Şeker Pancarı Genotiplerinde Test Edilmesi

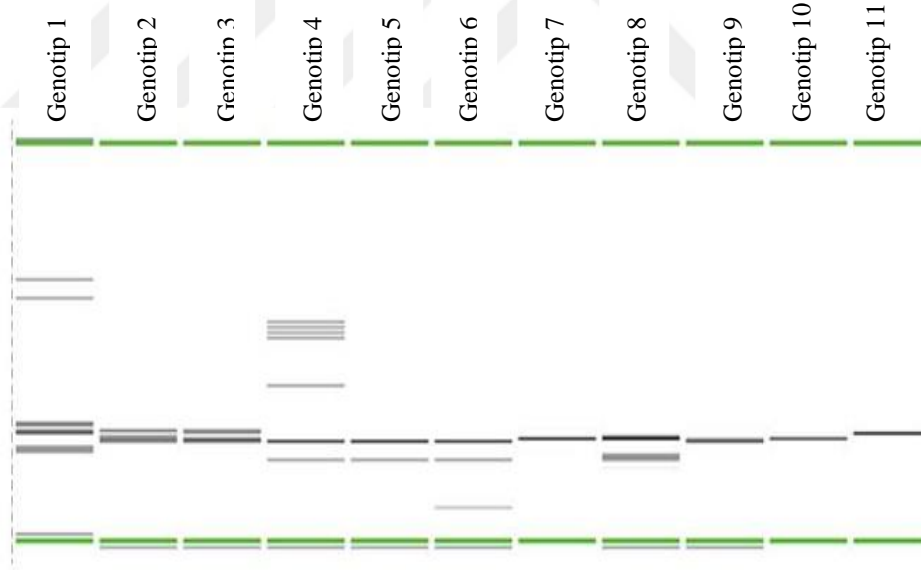
9 biber kromozomunun tümünü temsil eden 10 SSR markörü, 11 şeker pancarı genotipinde polimorfizm bakımından test edilmiştir. Geliştirilmiş olan ve primer bilgisine sahip olan 48,736 markörden rastgele seçilmiş olan bu 10 markör, PCR işlemi gerçekleştirilerek analiz edilmiştir (primer bilgileri Tablo 3.1.'de belirtilmiştir). PCR işleminin sonucunda kapiler elektroforez yöntemi kullanılarak görüntüler elde edilmiştir.

Seçilmiş olan SSR markörlerinden 8 tanesi polimorfik, 2 tanesi polimorfik olmayan markördür yani çeşitlilik göstermemektedir (Tablo 4.8.). Bu bölümde, bunlardan polimorfik olan (çeşitlilik gösteren) 5 SSR markörü değerlendirilmiştir. Polimorfik SSR'ların kapiler elektroforez sonucu elde edilen görüntülerinde, bireylerin SSR lokusu bakımından birbirinden ayırt edilebileceği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.1., 4.2., 4.3., 4.4., 4.5.'te gösterilmiş ve yorumlanmıştır.



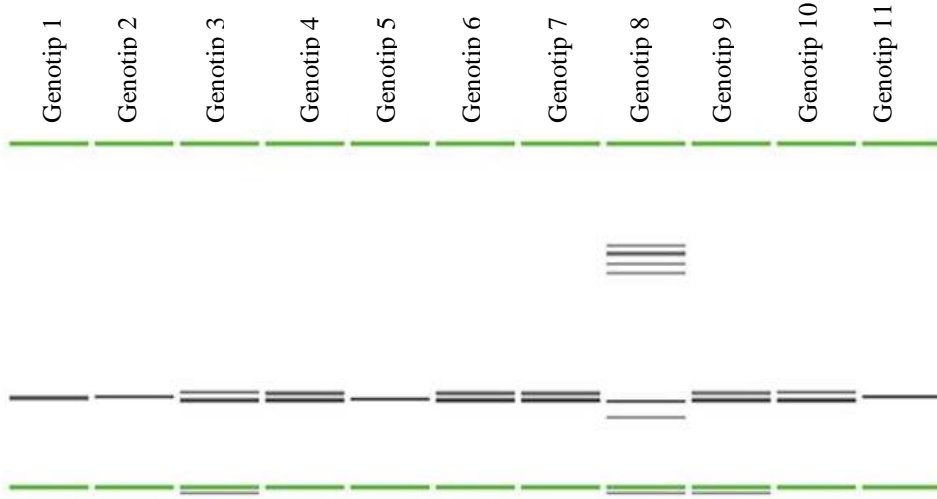
Şekil 4.1. MKBVCHR1-234 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü

‘MKBVCHR1-234’ markörü, Genotip 6’yı diğer bireylerden bant sayısı olarak ayırt edebilen polimorfik bir markördür. Aynı zamanda bant büyüklüğündeki polimorfizm sayesinde bireyleri birbirinden ayırt edebilme kapasitesi artmaktadır.



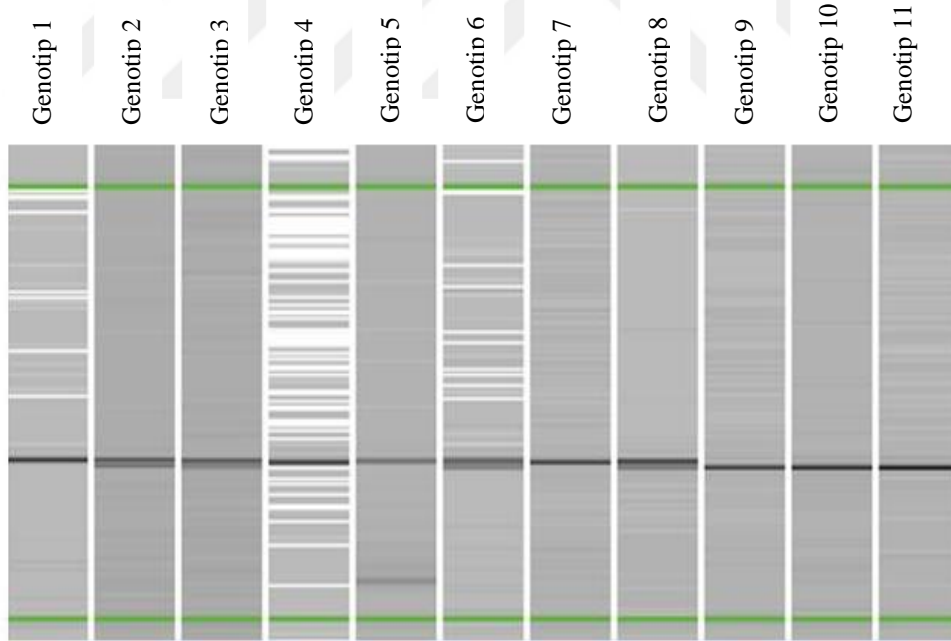
Şekil 4.2. MKBVCHR7-770 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü

‘MKBVCHR7-770’ markörünün hem bant sayısı olarak hem bant büyüklüğü olarak oldukça polimorfik bir markör olduğu görülmektedir. Genotip 1, genotip 4 ve genotip 6’nın spesifik bir şekilde diğer genotiplerden ayırt edilebildiği görülürken, diğer genotipler de bant büyüklüğü ile birbirlerinden ayırt edilebilmektedir.

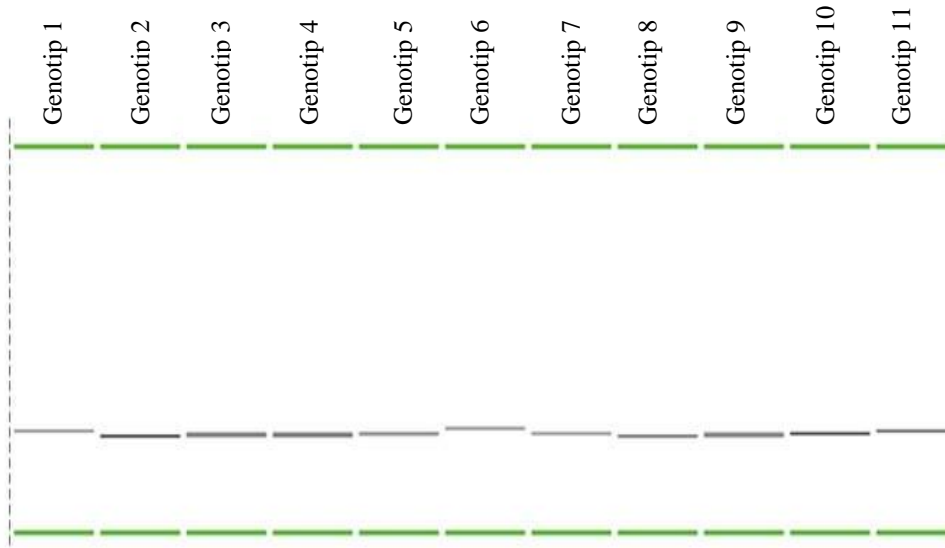


Şekil 4.3. MKBVCHR5-1011 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü

‘MKBVCHR5-1011’ markörünün genotip 8’i diğer genotiplerden spesifik bir şekilde ayırt edebildiği görülmektedir. Bu markörün, genotipleri birbirinden ayırt edebilmekten ziyade, genotipleri kendi içinde gruplandırabileceği görülmektedir.



Şekil 4.4. MKBVCHR2-2091 adlı markörün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü

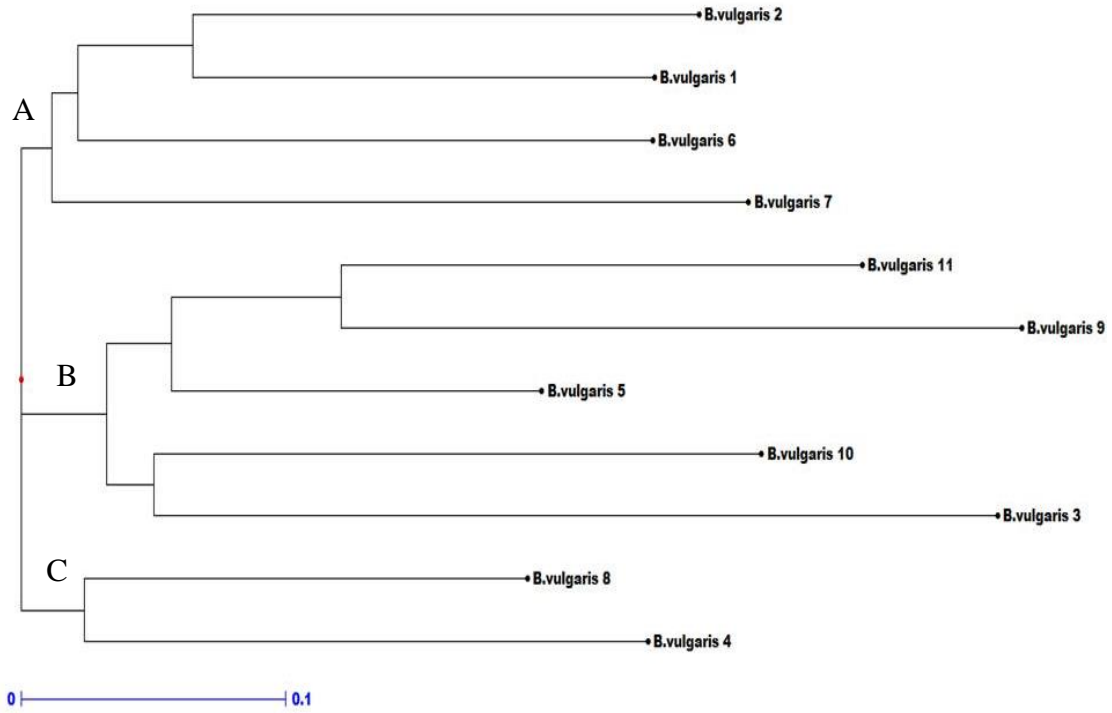


Şekil 4.5. MKBVCHR9-3048 adlı mark ör ün PCR analizi sonucu kapiler görüntüsü

‘MKBVCHR9-3048’ markörünün genel olarak genotiplerde aynı büyüklükte bant verdiği görülmektedir. Bu markör, sadece genotip 1 ve 6’yı diğer bireylerden ayırt edebilmektedir. Polimorfizm oranının bu bireyler için yüksek olmadığı söylenebilir.

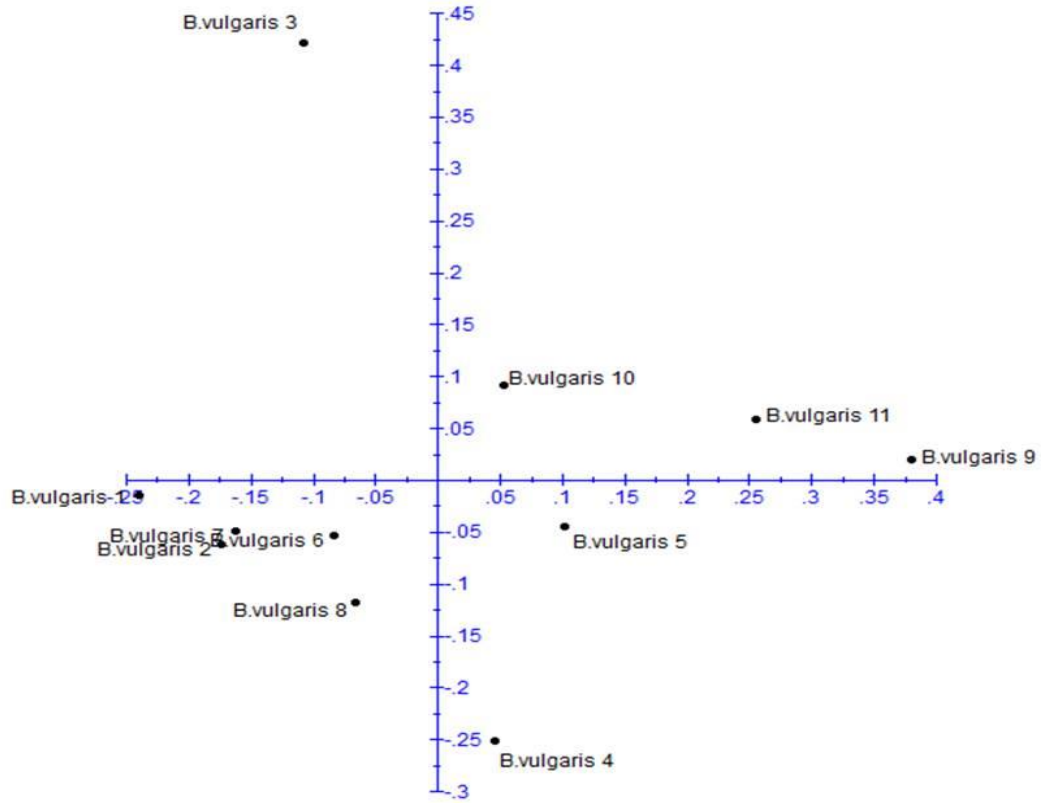
4.2.1. Test edilen markörlerin polimorfizm performansı

Polimorfizm için test edilen markörler, barındırdıkları polimorfizm bilgisi sayesinde, 11 şeker pancarı genotipini birbirinden ayırt edebilmek ve sınıflandırabilmek için analiz edilmiştir. Bu analiz, Darwin (Perrier ve Jacquemond-Collet, 2006) yazılımı kullanılarak ve Neighbour-joining yöntemi uygulanarak bir dendrogram çizilerek gerçekleştirilmiştir ve şeker pancarı genotipleri arasındaki genetik ilişki gösterilmiştir. Test edilen markörlerin genotipleri kendi içinde gruplandırabildiği görülmektedir. Analiz sonucu Şekil 4.6. ve Grafik 4.5.’te gösterilmiş ve değerlendirilmiştir.



Şekil 4.6. Neighbour-joining yöntemi ile çizilmiş olan dendrogram

Markörlerin, 11 genotipi, benzerliklerine ve genetik ilişkilerine göre 3 gruba ayırdığı görülmektedir (A,B ve C). 1, 2, 6 ve 7 numaralı bireyler A grubunda, 11, 9, 5, 10 ve 3 numaralı bireyler B grubunda, 8 ve 4 numaralı bireyler C grubunda toplanmıştır. '2 – 1, 11 – 9, 10 – 3 ve 8 – 4' numaralı bireylerin birbirlerine olan benzerlik oranlarının, diğer bireylere göre daha yüksek olduğu görülmektedir.



Grafik 4.5. Genotiplerin birbirlerine olan uzaklık ve yakınlıklarının gösterimi

Bu grafikte genotiplerin birbirlerine olan uzaklık ve yakınlık ilişkileri gösterilmektedir. *B. vulgaris* 1 genotipi ile *B. vulgaris* 9 genotipinin birbirine en uzak bireyler olduğu görülmektedir. Aynı şekilde *B. vulgaris* 10 genotipi ile *B. vulgaris* 4 genotipinin birbirine olan uzaklığı diğer bireylere göre fazladır.

Şekil 4.6.'da belirtilen birbirine benzerlik oranları yüksek olan bireylerin (2 – 1, 11 – 9, 10 – 3 ve 8 – 4), x eksenine dikkate alındığında, bu grafikte birbirlerine yakın olduğu görülmektedir.

4.2.3. Test edilen markörlerin PIC değerleri

PIC (polimorfizm bilgi içeriği) değeri, bir markörün polimorfizm oranını belirtmektedir. PIC değerinin yüksek olması markörün polimorfik olma durumunu, PIC değerinin düşük olması markörün polimorfik olmama durumunu belirtmektedir (Saal ve Wricke, 1999). Markörlerin PIC (polimorfizm bilgi içeriği) değeri hesaplanmış ve Tablo 4.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Markörlerin PIC değerleri

Markör Adı	PIC	Alel sayısı
MKBVCHR1-234	0.48	6
MKBVCHR2-2091	0.36	5
<i>MKBVCHR3-1498</i>	N	0
MKBVCHR4-1036	0.42	2
MKBVCHR5-1011	0.56	6
MKBVCHR6-4290	0.32	3
MKBVCHR7-770	0.42	6
<i>MKBVCHR7-3251</i>	N	0
MKBVCHR8-1822	0.46	3
MKBVCHR9-3048	0.58	6
Polimorfik Toplam alel		37
Polimorfik markör ortalama PIC/alel	0.45	4.62

Polimorfizm oranı yüksek olan markörler kalın puntolarla gösterilmiştir.
Polimorfik olmayan markörler kırmızı ve italik belirtilmiştir.

PIC değeri yüksek olan markörler birden fazla alel üretebilirken, PIC değeri '0' olan markörler alel üretememektedirler. Tablo 4.8.'de de olduğu gibi PIC değeri arttıkça, markörün ürettiği alel miktarı da artmaktadır. Bir başka deyişle, PIC değeri yüksek olan markörler için, işlem sonucunda görüntü elde ederken, bant sayısı veya bant büyüklüğü olarak bireyler arasında farklılıklar görülmesi beklenmektedir. PIC değeri '0' olan markörler ise monomorfik markörlerdir ve bunlardan tek bir bant görüntüsü elde edilebilmektedir.

'MKBVCHR1-234', 'MKBVCHR2-2091', 'MKBVCHR5-1011', 'MKBVCHR7-770' ve 'MKBVCHR9-3048' markörleri polimorfizm oranı yüksek markörlerdir ve 'Geliştirilen SSR Markörlerinin Şeker Pancarı Genotiplerinde Test Edilmesi' bölümünde bu markörlerin kapiler görüntüleri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada seçilmiş olan 10 SSR markörü için ortalama PIC değeri 0.45 olarak bulunmuştur ve bu markörlerin ürettikleri toplam alel sayısı 4.62 olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.8.).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Beta vulgaris, tüm dünyada şeker ihtiyacını karşılamasından dolayı ekonomik öneme sahip bir bitkidir. Bu önemine rağmen şeker pancarında yapılan markör geliştirme veya mikrosatelit markör tespit çalışmaları sınırlıdır. Elimizde var olan genetik bilgi arttıkça yapılan çalışmalardan daha doğru ve daha verimli sonuçlar alınabilecektir. Bu çalışma, şeker pancarı genomunun (var olan tüm 9 kromozomunun), mikrosatelit markörleri tarafından analizi ile bilim dünyasına önemli çıktılar sunmaktadır.

SSR markörleri, genetik çeşitliliği incelemek için iyi performans gösterir, kodominant markörlerdir, genotiplenmesi özel laboratuvar ekipmanı gerektirmez ve markör destekli ıslah çalışmaları için uygundur. Böylece SSR markörleri, markör destekli ıslah çalışmaları için uygun bir araç haline gelmektedir (Uncu ve ark., 2015; Zhang ve ark, 2016) ve yaygın olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda markör bilgisi, bağlantı haritaları, QTL haritalama, çeşitlilik analizi, genetik ilişki analizi, istenilen gen bölgelerinin belirlenebilmesi ve seçilebilmesi gibi çalışmaların temel taşı konumundadır.

Yapılmış olan çalışma kapsamında, 75,172 SSR lokusu ve primer sekans bilgisine sahip 48,736 SSR markörü tespit edilmiştir (ek veri dosyası). Markörler, fonksiyon analizi için şeker pancarının tanımlanmış protein sekansları ile blast edilmiştir ve anotasyon analizi ile olası protein fonksiyonları tespit edilmiştir (ek veri dosyası). Markör-protein ilişkilendirme çalışmaları için örnek olması bakımından, glutasyon için tespit edilmiş markörlerden 10 tanesi Tablo 4.7.' de gösterilmiştir. Aynı zamanda yapılan blast işlemi sonucu markör sekansları ile protein sekansları arasında %30 oranında eşleşme görülürken, %62 oranında eşleşme olmadığı görülmüştür (Grafik 4.2.). Bu oranın, şeker pancarında sekanslanmış protein sayısının artmasıyla artabileceği düşünülmektedir. Blast işlemi, şeker pancarının var olan tüm proteinleriyle değil, sadece erişebildiğimiz ve sekanslanmış olan proteinler üzerinden gerçekleştirilmiştir.

GMATA programı ile geliştirilmiş olan SSR markörlerinden 5 tanesi rastgele bir biçimde seçilerek, PCR işlemi ile analiz edilmiştir ve polimorfizm seviyelerine bakılmıştır. Bu markörlerin primer sekansları materyal metod kısmında Tablo 3.1.'de gösterilmiştir ve elde edilen sonuçlar, sonuçlar ve tartışma kısmında değerlendirilmiştir. Bu markörlerden 8 tanesinin polimorfik, 2 tanesinin monomorfik olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan PCR işleminin ardından DARWIN programı kullanılarak bir dendogram çizilmiş ve markörlerin, bireyler için genetik ilişki analizi yapılmıştır. Analiz sonucunda, polimorfik olan markörlerin, bireyleri birbirinden ayırt edebildiği, gruplandırabildiği ve sınıflandırabildiği görülmüştür. Yani tez kapsamında test edilen polimorfik SSR markörleri, şeker pancarı genotiplerinde çeşitlilik veya genetik ilişki analizlerinde kullanılabilir haldedir.

Test edilen 10 mikrosatelit markörünün PIC değerleri hesaplanmıştır ve polimorfik olan markörlerin çok sayıda alel üretebildikleri görülmüştür. PIC değerinin '0' dan yüksek olması, şeker pancarı genotipleri arasındaki genetik çeşitliliğin tespit edilmesinde önemli bir değerdir. Ve bu tez kapsamında geliştirilen 8 polimorfik markör, bu amaç için uygun bir hale gelmektedir.



KAYNAKLAR

- Aird D., Ross M.G., Chen W-S., Danielsson M., Fennel T., Russ C., Jaffe D.B., Nusbaum C., Gnirke A., 2011, Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries, *Genome Biology* 2011, 12:R18.
- Baird E., Cooper-Bland S., Waugh R., De Maine M., Powell W., 1992, Molecular characterisation of inter- and intro-specific somatic hybrids of potato using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers, *Molecular and General Genetics* 223 (3), 469-75.
- Bonin A., Pompanon F., Taberlet P., 2005, Use of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Markers in Surveys of Vertebrate Diversity, *Methods in Enzymology*, Vol. 395.
- Brar N.S., Dhillon B.S., Saini K.S., Sharma P.K., 2015, Agronomy of sugarbeet cultivation-A review, *Agricultural Reviews*, 36 (3) 2015 : 184-197.
- Ben-Ari G., Lavi U., 2012, Marker-assisted selection in plant breeding, DOI:10.1016/B978-0-12-381466-1.00011-0.
- Chapco W., Ashton N.W., Martel R.K., Antonishyn N., Crosby W.L., 1992, A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers, *Genome* 35,569-74.
- Chial H., 2008, DNA fingerprinting Using Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP), *Nature Education* 1(1):176.
- Church G.M., Gilbert W., 1984, "Genomic sequencing," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 81, no. 7, pp. 1991–1995.
- Collard B.C.Y., Mackill D.J., 2007, Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty first century, *Phil. Trans. R. Soc. B* (2008) 363, 557-572.
- Collins F.S., Morgan M., Patrinos A., 2003, "The Human Genome Project: lessons from large-scale biology," *Science*, vol. 300, no. 5617, pp. 286–290.
- Cosyn S., Woude K., Sauvenier X., Evrad J.N., 2011, Sugar beet: A complement to sugar cane for sugar and ethanol production in tropical and subtropical areas, *Intl. Sugar J.*, 113: 120-123.
- Dohm J.C., Minoche A.E., Holtgrawe D., Capella-Gutierrez S., Zakrzewski F., Tafer H., Rupp O., Sörensen T.R., Stracke R., Reinhardt R., Goesmann A., Kraft T., Schulz B., Stadler P.F., Schmidt T., Gabaldon T., Lenrach H., Weishaar B., Himmelbauer H., 2014, The genome of the recently domesticated crop plant sugar beet (*Beta vulgaris*), doi:10.1038/nature12817.

- Edwards A., Civitello A., Hammond H.A., Caskey C.T., 1991, DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats, *Am J Hum Genet* 49:746–756.
- Elshire, R.J., J.C. Glaubitz, Q. Sun, J.A. Poland, K. Kawamoto, E.S. Buckler, and S.E. Mitchell. 2011. A robust, simple genotyping-bysequencing (GBS) approach for high diversity species, *PLoS ONE* 6:e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379.
- Evans, L.T., 1997, Adapting and improving crops: the endless task., *Phil. Trans. R. Soc. B* 352, 901–906., (doi:10.1098/rstb. 1997.0069).
- Forrester J.V., Dick A.D., McMenamin P.G., Roberts F., Pearlman E., 2016, Chapter 3 – Genetics, *The Eye: Basic Sciences in Practice*, 2016, Pages, 130-156.e1.
- Foster J.T., Bull, R.L., Keim P.,S., 2011, Ricin Forensics: Comparisons to Microbial Forensics, *Microbial Forensics* (Second Edition).
- Fu Y.B., Peterson G.W., 2011, Genetic Diversity Analysis with 454 Pyrosequencing and Genomic Reduction Confirmed the Eastern and Western Division in the Cultivated Barley Gene Pool, doi:10.3835/plantgenome2011.08.0022.
- Fugate K.K., Fajardo D., Schlautman B., Ferrareze J.P., Bolton M.D., Campbell L.G., Wiesman E., Zalapa J., 2014, Generation and Characterization of a Sugarbeet Transcriptome and Transcript-Based SSR Markers, *The Plant Genome* 7.
- Gwakisa P.S., Kemp S.J., Teale A.J., 1994, Characterization of Zebu cattle breeds in Tanzania using random amplified polymorphic DNA markers, *Animal Genetics*, 1994, 25, 89-94.
- Hetzel D.J.S., Drinkwater R.D., 1992, The use of DNA Technologies for the conservation and improvement of animal genetic resources, FAO Expert Consultation on the Management of Global Animal Genetic Resources, *Rome*, April 1992.
- Huang N., Angeles E.R., Domingo J., Magpantay G., Singh S., Zhang G., Kumaravadivel N., Bennett J., Khush G.S., 1997, Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR, *Theor Appl Genet* (1997) 95:313-320.
- Huang J.K., Pray C., Rozelle S., 2002, Enhancing the crops to feed the poor, *Nature* 418, 678–684. (doi:10.1038/nature01015).
- Jacob H.J., Lindpaintner K., Kusumir E.L., Bunkery K., Mao I.P., Gantenv D., Dzau J, Lander E.S., 1991, Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat, *Cell* 67:213–224.
- Jiang G-L., 2013, Molecular markers and marker-assisted breeding in plants, In: Andersen SB (ed) *Plant breeding from laboratories to fields*, *InTech*, Croatia, pp 45–83.

- Jiang G-L., 2015, Molecular Marker-Assisted Breeding: A Plant Breeder's Review, *Springer International Publishing Switzerland*, DOI 10.1007/978-3-319-22521-0_15.
- Kalia R.K., Rai M.K., Kalia S., Singh R., Dhawan A.K., 2011, Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants, *Euphytica* (2011) 177:309-334.
- Kumar R., Pathak A.D., 2013, Recent trend of sugarbeet in world, Souvenir- IISR- Industry Interface on Research and Development Initiatives for Sugarbeet in India, 28-29 May, Sugarbeet Breeding Outpost of IISR IVRI Campus, Mukteswar-263138, Nainital, Organised by Indian Institute of Sugarcane Research (ICAR) and Association of Sugarcane Technologists of India, pp 46-47.
- Lagercrantz U, Ellegren H, Andersson L (1993) The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates, *Nucleic Acids Res* 21:111–1115
- Li J., Schulz B., Stich B., 2010, Population structure and genetic diversity in elite sugar beet germplasm investigated with SSR markers, *Euphytica* (2010) 175:35-42.
- Liu L, Li Y., Li S., Hu N., He Y., Pong R., Lin D., Lu L., Law M., 2012, Comparison of Next-Generation Sequencing Systems, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* Volume 2012, Article ID 251364, 11 pages doi:10.1155/2012/251364.
- Litt M., Luty J.A., 1989, A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene, *Am J Hum Genet* 44: 397–401.
- Lu S.C., 2013, Glutathione Synthesis, *Biochimica et Biophysica Acta* 1830 (2013) 3143-3153.
- Mackill D.J., Nguyen H.T., Zhang J., 1999, Use of molecular markers in plant improvement programs for rainfed lowland rice, *Field Crops Res.* 64, 177–185. (doi:10. 1016/S0378-4290(99)00058-1).
- Madabhushi R.S., 1998, Separation of 4-color DNA sequencing extension products in noncovalently coated capillaries using low viscosity polymer solutions, *Electrophoresis* 19, 224–230.
- Mardis E.R., 2008, The impact of next-generation sequencing technology, *Trends in Genetics*, Volume 24, Tissue 3, P133-141.
- Martin G.B., Brommonschenkel S.H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M.W., Spivey R., 1993, Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato, *Science*, 262, 1432–1436.
- Martin G.B., Frary A., Wu T., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Earle, E.D., 1994, A member of the tomato Pto gene family confers sensitivity to fenthion resulting in rapid cell death, *Plant Cell*, 6, 1543–1552.

- Matsuoka H., , Kosai Y., Saito M., Takeyama N., Suto H., 2002, Single-cell viability assessment with a novel spectro-imaging system, *J Biotechnol* 94(3):299-308.
- McPherson J.D., 2009, Next-generation gap, *Nature Methods*.
- Metzker M.L., 2009, Sequencing technologies – the next generation, *Nature Reviews*, doi:10.1038/nrg2626.
- Meudt, H.M., Clarke, A.C., 2007, Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances, *Trends in Plant Science*, 12, 106–117.
- Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V., 1991, Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 88,9828-32.
- MonteiroF., Frese L., Castro S., Duarte M.C., Paulo O.S., Louriero J., Romeiras M.M., 2018, Genetic and Genomic Tools to Assist Sugar Beet Improvement: The value of the Crop Wild Relatives, doi: 10.3389/fpls.2018.00074.
- Morgante M, Olivieri AM (1993) PCR – amplified SSRs as markers in plant genetics. *Plant J* 3:175–182
- Mörchen M., Cuguen J., Michaelis G., Hanni C., Laprade P.S., 1996, Abundance and length polymorphism of microsatellite repeats in *Beta vulgaris* L., *Theor Appl Genet* 92:326–333
- Mueller, U.G., Wolfenbarger, L.L., 1999, AFLP genotyping and fingerprinting, *Trends in Ecology & Evolution*, 14, 389–394.
- Nei M. ve Li W.H., (1979), Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 76, No. 10, pp. 5269-5273.
- Okada M., Lanzatella C., Saha M.C., Bouton J., Wu R., Tobias, C.M., 2010, Complete switchgrass genetic maps reveal subgenome collinearity, preferential pairing, and multilocus interactions, *Genetics*, genetics, 110, 113910.
- Ortiz R., 1998, Critical role of plant biotechnology for the genetic improvement of food crops: perspectives for the next millennium, *Electron. J. Biotechnol.* 1(3), [cited 15 August]. (doi:10.2225/vol1-issue3-fulltext-7).
- Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A., 2011, Sequencing Technologies and genome sequencing, DOI 10.1007/s13353-011-0057-x.
- Parida S.K., Kalia S.K., Sunita K., Dalal V., Hemaprabha G., Selvi A., Pandit A., Singh A., Gaikwad K., Sharma TR., Srivastava P.S., Singh N.K., Mohapatra T., 2009, Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane, *Theor Appl Genet* 118:327–338.

- Pathak, A.D. and R. Kapur, 2013, Current Status of Sugar Beet Research in India, pp: 08–14, Souvenir-IISR-Industry Interface on Research and Development Initiatives for Sugar beet in India, 28–29 May, Sugar beet Breeding Outpost of IISR IVRI Campus, Mukteswar-263138, Nainital, Organized by Indian Institute of Sugar cane Research (ICAR) and Association of Sugar cane Technologists of India.
- Perrier X., Jacquemoud-Collet J.P., 2006, DARwin software, <http://darwin.cirad.fr/dar>.
- Peterson G.W., Ding Y., Harboch C., Bi Fu Y., 2014, Genotyping-By-Sequencing for Plant Genetic Diversity Analysis: A Lab Guide for SNP Genotyping, *Diversity*.
- Pingali P.L., Heisey P.W., 1999, Cereal crop productivity in developing countries, *CIMMYT Economics Paper 99-03*. CIMMYT, Mexico, DF.
- Poland J.A., Rife T.W., 2012, Genotyping-by-Sequencing for Plant Breeding and Genetics, *The Plant Genome* 5:92-102.
- Poland, J.A., P.J. Brown, M.E. Sorrells, and J.-L. Jannink. 2012a. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE* 7:e32253. doi:10.1371/journal.pone.0032253
- Poland J., Endelman J., Dawson J., Rutkoski J., Wu S., Manes Y., Dreisigacker S., Crossa J., Sancez-Villeda H., Sorrells M., Janninck J-L., 2012b, Genomic Selection in Wheat Breeding using Genotyping-by-Sequencing, *The Plant Genome* 5:103-113.
- Powell W., Machray G.C., Provan J., 1996, Polymorphism revealed by simple sequence repeats, *Trends Plant Sci* 1:215–222.
- Pratt C.W., Gill K., Barrett N., Roberts M., 2014, Symptoms and Etiology of Serious Mental Illness, *Psychiatric Rehabilitation* (Third Edition).
- Prober J.M. ve ark., 1987, A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain terminating dideoxynucleotides, *Science* 238, 336–341.
- Quail A.M., Kozarewa I., Smith F., Scally A., Stephens P.J., Durbin R., Swerdlow H., Turner D.J., 2008, A large genome center's improvements to the Illumina Sequencing system, 2008 *Nature Publishing Group*.
- Refat A.A.H., Ghaffar M.S.A., 2010, The economic impact of sugar beet cultivation in new lands (Study of Al-Salam Canal Area Status), *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(7): 1641-1649.
- Ruttan V.W., 1999, The transition to agricultural sustainability, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 96, 5960–5967. (doi:10.1073/pnas.96.11.5960).
- Saal B. ve Wricke G., 1999, Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.), *Genome*. 42(5):964-72.

- Sanger F ve ark., 1977, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Saraswathy N., Ramalingam P., 2011, Genome Mapping, *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*.
- Schmidt T., Schwarzacher T., Heslop-Harrison J.s., 1994, Physical mapping of rRNA genes by fluorescent in-situ hybridization and structural analysis of 5S rRNA gene and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*), *Theor Appl Genet* (1994) 88:629-636.
- Schuster S.C., 2008, Next-generation sequencing transforms today's biology, 2008, *Nature Publishing Group*.
- Sher A., Kashif M., Nawaz A., Sattar A., Manaf A., Qayyum A., Ijaz M., 2019, Genotypes versus Sowing Methods and their Interactive Effects on Sugar Beet (*Beta vulgaris*) Performance for Morphological and Yield Attributes under Arid Climatic Conditions, *INTERNATIONAL JOURNAL OF AGRICULTURE & BIOLOGY* ISSN Print: 1560–8530; ISSN Online: 1814–9596 18–0762/2019/22–1–29–34 DOI: 10.17957/IJAB/15.1029.
- Shrivastava A.K., Shukla S.P., Sawnani A., 2013, Useful products from sugarbeet, Souvenir-IISR-Industry Interface on Research Development Initiatives for Sugarbeet in India, 28-29 May, Sugarbeet Breeding Outpost of IISR IVRI Campus, Mukteswar-263138, Nainital, Organised by Indian Institute of Sugarcane Research (ICAR) and Association of Sugarcane Technologists of India, pp 43-45.
- Simko I., Eujayl I., van Hintum T.J.L., 2012, Empirical evaluation of DArT, SNP and SSR marker-systems for genotyping, clustering, and assigning sugar beet hybrid varieties into populations, *Plant Science* 184 (2012) 54-62 .
- Slafer G.A., Araus J.L., Royo C., Del Moral L.F.G., 2005, Promising eco-physiological traits for genetic improvement of cereal yields in Mediterranean environments, *Ann. Appl. Biol.* 146, 61–70. (doi:10.1111/j.1744- 7348.2005.04048.x).
- Smailus D.E. ve ark., 2005, Simple, robust methods for high-throughput nanoliter-scale DNA sequencing, *Genome Res.* 15, 1447–1450.
- Smith J.S.C., Smith O.S., 1992, Fingerprinting crop varieties, *Rev Agric Acad Press*, USA.
- Smulders M.J.M., Esselink G.D., Everaert I., Riek J.D., Vosman B., 2010, Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers, *BMC Genetics*, 11:41.
- Sorof Uddin M., Cheng Q., 2015, Recent application of biotechniques for the improvement of mango search, *Applied Plant Genomics and Biotechnology*.

- Tedersoo L., Nilsson R.H., Abarenkov K., Jairus T., Sadam A., Saar I., Bahram M., Bechem E., Chuyong G., Koljag U., 2010, 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases, *New Phytologist* (2010) 188:291-301.
- Thiel T., Kota R., Grosse I., Stein N., Graner A., 2004, SNP2CAPS: a SNP and INDEL analysis tool for CAPS marker development, *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, No. 1.
- Treangen T.J., Salzberg S.L., 2012, Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions, *Nature Reviews Genetics* 13, 36-46 (2012).
- Trethowan R.M., Reynolds M., Sayre K., OrtizMonasterio I., 2005, Adapting wheat cultivars to resource conserving farming practices and human nutritional needs, *Ann. Appl. Biol.* 146, 405–413. (doi:10.1111/j.1744-7348.2005.040137.x).
- Udagawa H., Ishimaru Y., Li F., Sato Y., Kitashiba H., Nishio T., 2010, Genetic analysis of interspecific incompatibility in *Brassica rapa*, *Theoretical and Applied Genetics*, 121(4), 689–696.
- Uncu A.T., 2018., Genome-wide identification of simple sequence repeat (SSR) markers in *Capsicum chinense* Jacq. with high potential for use in pepper introgression breeding, *Biologia*.
- Uncu AT, Celik I, Devran Z, Ozkaynak E, Frary A, Doganlar S, 2015, Development of a SNP-based CAPS assay for the Me1 gene conferring resistance to root knot nematode in pepper, *Euphytica* 206:393–399. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1489-x>.
- Van Geyt J.P.C., Lange W., Oleo M., de Bock Th.S.M., 1990, Natural variation within the genus *Beta* and its possible use for breeding sugar beet: A review, *Euphytica* 49: 57-76, 1990.
- Varshney R.K., Graner A., Sorrels M.E., 2005, Genomics-assisted breeding for crop improvement, *Trends Plant Sci.* 10, 621–630.
- Varshney R.K., Hoisington D.A., Tyagi A.K., 2006, Advances in cereal genomics and applications in crop breeding, *Trends Biotechnol.* 24, 490–499.
- Varshney R.K., Nayak S.N., May G.D., Jackson S.A., 2009, Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding, *Trends in Biotechnology* doi: 10.1016/j.tibtech.2009.05.006.
- Voelkerding K.V., Dames S.A., Durtschi J.D., 2009, Next-Generation Sequencing: From Basic Research to Diagnostics, *Clinical Chemistry* 55(4):641-58.
- Wang Z, Weber JL, Zhong G, Tanksley SD (1994) Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theor Appl Genet* 88:1–6

- Wang X., Wang L., 2016, GMATA: An Integrated Software Package for Genome-Scale SSR Mining, Marker Development and Viewing, *Front. Plant Sci.*, 13 Sept. 2016.
- Wang M., Xu Y., Wu Z., Wang H., Zhang H., 2018, High Density Genetic Map Construction in Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.) by High-Throughput Technology, *Sugar Tech* (Mar-Apr 2018) 20(2):212-219 – *Springer*.
- Welsh J., McClelland M., 1991, Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers, *Nucleic Acids Research*, 19, 5275-9.
- Wilkie S. E., Isaac P. G., Slater R. J., 1993, Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*, *Theor Appl Genet* (1993) 86:497 – 504.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research* 18,6531-5.
- Yang X., Yan J., Shah T., Warburton M., Li Q., Li L., 2010, Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection, *Theoretical and Applied Genetics*, 121(3), 417–431.
- Zane L., Bargelloni L., Patarnello T., 2002, Strategies for microsatellite isolation: a review, *Mol Ecol* 11:1–16.
- Zhang XF, Sun HH, Xu Y, Chen B, Yu SC, Geng SS, Wang Q, 2016, Development of a large number of SSR and InDel markers and construction of a high-density genetic map based on a RIL population of pepper (*Capsicum annum* L.), *Mol Breeding* 36:92. [https:// doi.org/10.1007/s11032-016-0517-4](https://doi.org/10.1007/s11032-016-0517-4), *Biologia*.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatıma ŞEN
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Konya 1995
Telefon : +90 552 432 4993
Faks : -
e-mail : fatima.sen@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	: Enderun Anadolu Lisesi, Karatay, Konya	2013
Üniversite	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	2017
Yüksek Lisans	: Necmettin Erbakan Üniversitesi, Meram, Konya	Halen
Doktora	: -	

YABANCI DİLLER

İngilizce

İŞ DENEYİMLERİ

Necmettin Erbakan Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Konya, 2016
Max Planck Moleküler Bitki Fizyoloji Enstitüsü, Potsdam, 2018